



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis de Maestría en Plantas Medicinales

"Estudio farmacológico del Isoespintanol, metabolito
secundario aislado de hojas de *Oxandra cf.*
xylopioides"

Tesista: Ing. Tatiana Carolina Gavilánez Buñay

Directora: Prof. Dra. Alicia E. Consolini

Codirector: Msc. Qco Guillermo Schinella

Año 2016

Dedico esta tesis

- A mis padres Nelly y Mario que a pesar de la distancia siempre estuvieron presentes en mi corazón.
- A mis hermanos Santiago, Daniel y a mis sobrinas Anely y Maylen.

AGRADECIMIENTOS

A las Facultades de Ciencias Exactas y Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata, por permitirme realizar esta Tesis de Maestría en Plantas Medicinales.

A mi Directora de Tesis la Dra. Alicia Consolini por su apoyo, paciencia y sobretodo por su amistad durante estos dos años.

A mi Co-director el Msc. Guillermo Schinella por toda la paciencia y ayuda brindada.

Al Dr. Benjamín Rojano y a la Dra. Paula Galeano de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín por haberme suministrado los compuestos Isoespintanol y sus derivados para estudiar en esta tesis.

A todos los docentes que son parte de la Maestría por todos sus conocimientos impartidos.

A María Inés Ragone, Matías, Germán, Lara, Lucía y a todos los miembros del Laboratorio de Farmacología de la UNLP por su apoyo y ayuda incondicional.

A mi tía Guadalupe Enríquez y Washington Buñay que gracias a su apoyo y confianza logré cumplir este sueño.

A toda mi familia de Ecuador quienes siempre me apoyaron a la distancia durante este período.

A mis amigos que siempre estuvieron presentes Diana Carolina, Milena, Silvina, Diana María y Pablo.

INDICE

RESUMEN

1. <u>Introducción</u>	3
1.1 Historia del uso de las plantas medicinales	4
1.2 Etnomedicina y productos naturales	4
1.3 Metabolismo vegetal como origen de los principios activos	7
1.4 La Familia Annonaceae	8
1.4.1 El género <i>Oxandra</i>	9
1.4.2 <i>Oxandra xylopiodes</i>	10
1.5 Principios activos de interés biológico en esta tesis	11
1.5.1 Isoespintanol y sus derivados	11
1.5.2 Análogos estructurales del Isoespintanol.	13
1.5.2.1 Floroglucinol	14
1.5.2.2 Trimetoxibenceno	15
1.6 Base para el estudio de las propiedades antiespasmódicas	15
1.6.1 Características contráctiles del músculo liso	15
1.6.2 Mecanismo general de contracción y relajación de músculo liso	16
1.6.3 Intestino	19
1.6.4 Vejiga	20
1.6.5 Útero	23
1.7 Actividad citotóxica del Isoespintanol y sus derivados	25
2. <u>Hipótesis.</u>	31
3. <u>Objetivos</u>	32
4. <u>Materiales y métodos</u>	33
4.1 Compuestos ensayados	34
4.2 Preparación de las diluciones	34
4.3 Animales	35
4.4 Preparados biológicos	36
4.5 Evaluación de la actividad antiespasmódica	37
4.5.1 En la contracción de intestino	37
4.5.2 En la contracción de vejiga	38
4.5.3 Mediante curvas de relajación en vejiga	39
4.5.4 En la contracción uterina	39
4.5.5 Mediante curvas de relajación en útero	40
4.6 Soluciones empleadas y curvas concentración respuesta	41
4.6.1 Intestino y vejiga	41
4.6.2 Útero	41
4.7 Cálculo de parámetros	41
4.8 Actividad citotóxica del isoespintanol y sus derivados	44
4.8.1 Cultivo de células	44
4.8.2 Ensayo MTT	44
4.8.3 Tratamiento de las células para el estudio de citometría	45
4.8.4 Ensayo de exclusión de Yoduro de propidio	45
4.8.5 Análisis de núcleos hipodiploides	46
4.8.6 Análisis de la externalización de fosfatidilserina	46

4.9 Análisis de la externalización de fosfatidilserina	48
5. Resultados	50
5.1 Estudios de la actividad antiespasmódica	50
5.1.1 Efectos antiespasmódicos en intestino	50
5.1.1.1 De Isoespintanol	50
5.1.1.2 De Trimetoxibenceno	51
5.1.1.3 De Floroglucinol	52
5.1.1.4 Comparación de las potencias de los antagonistas en intestino	53
5.1.2 Efectos antiespasmódicos en vejiga	54
5.1.2.1 De Isoespintanol	54
5.1.2.2 De Trimetoxibenceno	55
5.1.2.3 De Floroglucinol	57
5.1.2.4 Efectos relajantes sobre la contractura de carbacol en vejiga	57
5.1.2.5 Efectos de ISO sobre la vejiga bajo estimulación de campo eléctrico	58
5.1.2.6 Efectos antiespasmódicos de verapamilo sobre vejiga	60
5.1.2.7 Comparación de las potencias de los antagonistas en vejiga	61
5.1.3 Efectos antiespasmódicos en útero	61
5.1.3.1 De Isoespintanol	61
5.1.3.2 Efectos de Isoespintanol sobre la contractura inducida por 5-HT en útero	62
5.1.3.3 Efectos de Adrenalina sobre la contractura inducida por 5-HT en útero	64
5.1.4 Efectos sobre el influjo a través de canales de Ca^{2+}	65
5.1.4.1 De Isoespintanol en intestino	65
5.1.4.2 De Isoespintanol en vejiga	66
5.1.4.3 De Trimetoxibenceno en vejiga	67
5.1.5 Comparación de las potencias de los antagonistas	67
5.2 Actividad citotóxica del Isoespintanol y sus derivados	69
6. Discusión	73
7. Conclusiones	82
8. Referencias	84

RESUMEN

Isoespintanol (ISO) es un monoterpeno aislado del extracto hexánico de *Oxandra cf xylopioides* Diels. (Annonaceae) con actividad antioxidante (Rojano y col., 2007). Estructuralmente ISO posee similitud con el compuesto trifenólico floroglucinol (Phg) y con su derivado metoxilado el trimetoxibenceno (TMB). Estos dos compuestos son empleados en terapéutica asociados en formulaciones orales e inyectables, para tratar espasmos biliares, urinarios y uterinos, generalmente en caso de cálculos (Boukef y col. 2010). Por ello se hipotetizó que ISO tendría propiedades antiespasmódicas en músculo liso también. El objetivo general del presente trabajo fue estudiar las propiedades farmacológicas de ISO en intestino, vejiga y útero aislados de rata y su posible actividad citotóxica. Se realizaron curvas concentración respuesta (CCR) en intestino y vejiga con el agonista colinérgico carbacol (Cbl), y en útero con serotonina (5HT), en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de los compuestos ISO, Phg y TMB. Como efecto se midieron los cambios en la contractilidad isométrica. Para evaluar la interferencia con el influjo de Ca^{2+} se realizaron CCR de CaCl_2 en medio despolarizante en intestino y vejiga. Como resultados se obtuvo que ISO se comportó como antiespasmódico, ya que inhibió no competitivamente a la CCR-Cbl con una afinidad $\text{pK}(\text{ISO})$ estimada en 4.78 ± 0.09 en intestino y 4.60 ± 0.09 en vejiga. El antagonismo no-competitivo también fue producido por Phg y TMB, pero ISO fue 8 veces más potente que TMB y similarmente potente que Phg en intestino, mientras en vejiga el ISO resultó 8 veces más potente que TMB. Además la inhibición máxima del efecto de las CCR siguió el orden $\text{ISO} > \text{TMB} > \text{Phg}$ en intestino, y en vejiga $\text{Iso} > \text{TMB}$. ISO también inhibió en modo no competitivo y completo la CCR de Ca^{2+} en intestino, con un $\text{pK}(\text{ISO})$ de 5.1 ± 0.1 en intestino, y de 4.32 ± 0.07 en vejiga. Los efectos de ISO en intestino y vejiga difirieron de los obtenidos con TMB y Phg, sugiriendo diferentes mecanismos. En útero el ISO redujo la contracción producida por 5HT de manera no competitiva y completa con $\text{pK}(\text{ISO})$

5.05 ± 0.07. Los resultados demuestran que ISO es un muy buen antiespasmódico intestinal, urinario y uterino, con mayor eficacia intrínseca y mayor potencia (menor CI50) que los derivados de uso comercial. Su mecanismo de acción es la interferencia con el influjo de calcio al músculo liso visceral.

Por otra parte el Isoespintanol y su derivado bromuro de isoespintanol (BrI) demostraron no ser citotóxicos a concentraciones menores de 10 µM en el modelo experimental utilizado y por ende no afectaron la viabilidad de los macrófagos RAW 257.4. El hecho de que el BrI no afecta la viabilidad de los macrófagos y con la capacidad de inducir apoptosis en PMN humanos, lo convierte potencialmente en un fármaco que podría intervenir en la etapa de la resolución del proceso inflamatorio mejorando la apoptosis de las células PMN sin afectar la función de los macrófagos.

Palabras clave: antiespasmódico, bloqueante de calcio, vejiga, intestino, útero, macrófagos murinos, citotoxicidad, apoptosis, necrosis.

Abreviaturas: BrI (Bromuro de Isoespintanol), Cbl (Carbacol), CCR (Curva concentración respuesta), DMI (Isoespintanol desmetilado), ISO (Isoespintanol), 5-HT (serotonina), MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), Phg (Floroglucinol), PMN (Polimorfos nucleares), TMB (Trimetoxibenceno), Vpl (Verapamilo).

1. INTRODUCCION

1.1. Historia del uso de las plantas medicinales

La utilización de plantas con propósitos curativos se remonta al principio de la historia de la humanidad. Desde siempre el hombre acudía a la naturaleza en busca de plantas para mejorar su salud y a la vez para su alimento. Esta búsqueda siempre fue por medio de aciertos y errores, siendo este conocimiento transmitido de generación en generación por los ancestros (Hernández & Gally, 1981).

Existen evidencias en yacimientos con una antigüedad superior a los 3000 años que demuestran el uso de algunas plantas como *Echium vulgare* usada contra las mordeduras de serpiente, *Lithospermum officinale* utilizada para disolver cálculos biliares, *Fumaria sp.* como depurativo y *Papaver somniferum* como calmante o tranquilizante. Además, se han descubierto restos fosilizados de cola de caballo (*Equisetum sp.*), utilizada en la actualidad como diurético, es decir para estimular la producción de orina, para remineralizar los huesos y cortar hemorragias (Castro & Rivera, 1991).

1.2 Etnomedicina y productos naturales

La Etnomedicina se ocupa del estudio de las plantas que son empleadas por los diversos grupos étnicos de personas para curar ciertos males o enfermedades. Por un lado, se transforma en una herramienta para descubrir nuevas posibles drogas con propiedades medicinales. Por el otro, permite encontrar las bases científicas que avalan o descartan el uso popular de dichas plantas, y transferir el conocimiento. Para llevar a cabo los estudios que dan los conocimientos a la Etnomedicina se requieren de varias ciencias aplicadas (Hota, 2007).

Estas ciencias que abastecen de conocimientos a la Etnomedicina involucran procedimientos como la observación, descripción e investigación experimental de todas las

propiedades en cada campo (“*screening*” fitoquímico y farmacológico). En resumen, la Etnomedicina utiliza varias ciencias como botánica, química, bioquímica, farmacología, fisiología, antropología, arqueología e historia que en conjunto contribuyen al descubrimiento de productos naturales con actividad medicinal (Hota, 2007). En principio, la Etnografía proporciona el conocimiento y acercamiento al grupo humano para recopilar sus conocimientos tradicionales. La Etnobotánica recopila, identifica y caracteriza a las plantas empleadas por un grupo humano determinado, y brinda parámetros botánicos para su posterior reconocimiento. La Etnofarmacología, analiza las propiedades farmacológicas que podrían dar aval al uso tradicional de la planta, buscando las actividades biológicas a partir del uso, en modelos experimentales que aproximen el efecto reportado por el grupo humano, y empleando el método científico en animales de laboratorio (“*in vivo*”), en tejidos aislados (“*ex vivo*”), o en métodos sobre moléculas o células de cultivo (“*in vitro*”). La Fitoquímica o Farmacognosia permiten identificar los principios activos presentes en dichas plantas medicinales, empleando reacciones de caracterización o métodos de aislamiento y/o identificación como por ejemplo, los métodos cromatográficos (Galbis, 2004).

La única fuente de medicamentos por muchos años fueron los productos de origen natural. Actualmente los principios activos provenientes de las plantas son alrededor del 30% de los empleados en la terapéutica y se aspira llegar al 50% aproximadamente. La mayoría de estos productos fueron usados por los indígenas a lo largo del tiempo y por esta razón la etnofarmacología juega un papel fundamental para encontrar nuevos principios activos u otros prototipos. Algunos ejemplos de estas plantas que han servido como medicamento después de haber sido documentadas por su uso en un grupo indígena americano son el de los glucósidos de la digital como cardiotónicos, los alcaloides del Papaver (morfina y codeína como analgésicos opiáceos) y de la quina (quinina como antimalárico, quinidina como antiarrítmico), el curare usado para envenenar las puntas de la lanza (como relajante muscular) los alcaloides de Atropa

belladona (atropina, escopolamina y hioscina como antimuscarínicos), y otras drogas como cocaína, pilocarpina, taxol, entre otras. En la actualidad, muchas plantas asiáticas componentes de la medicina ayurvédica se están estudiando como fuentes de nuevos principios activos. Por lo tanto la etnofarmacología se puede definir como el estudio científico interdisciplinario de agentes biológicamente activos y tradicionalmente empleados por el hombre (Galbis, 2004; Vanaclocha & Cañigüeral, 2003)

Al ser la etnofarmacología un punto de partida para las investigaciones con plantas medicinales, en la última década han incrementado las asociaciones para la investigación de estos principios activos, debido al aumentado consumo principalmente en Europa de extractos vegetales de uso medicinal que superó los 6.000 millones de dólares en 1993, y ha ido en aumento desde ese entonces. Caso similar se observa en Asia, Japón y Norteamérica con 2.300, 2.100, 1.500 millones de dólares en 1993 respectivamente (Vanaclocha & Cañigüeral, 2003).

Las cuatro metas de usar plantas como recurso de agentes terapéuticos son principalmente *aislar compuestos bioactivos* para usarlos directamente como drogas, como por ejemplo: digoxina, digitoxina, morfina, reserpina, taxol, vincristina; producir nuevas estructuras como base para *hemisíntesis de nuevos fármacos* con baja toxicidad y alta actividad como por ejemplo metformina, estatinas, warfarina, oxicodona, teniposido; *utilizar la planta o una parte de ella como terapia curativa*, por ejemplo, ginkgo, hipérico, ginseng entre las miles de plantas empleadas en terapéutica en el mundo, y finalmente emplear algunos compuestos como herramienta farmacológica no siempre terapéutica pero útil para descubrir receptores y mecanismos, como por ejemplo la yohimbina, nicotina, mescalina, ácido lisérgico entre otros (Hota, 2007).

1.3 Metabolismo vegetal como origen de principios activos

Los compuestos que se encuentran en los vegetales pueden proceder del metabolismo

primario de las plantas (glúcidos, lípidos y ceras, aminoácidos y proteínas, ácidos nucleicos, compuestos nitrogenados) o del metabolismo secundario (isoprenoides, derivados fenólicos, acetatos (Kuklinski, 2003).

Las plantas poseen diversidad de metabolitos secundarios como resultado de la evolución, los cuales les confieren propiedades iguales o superiores que los medicamentos de síntesis. Los metabolitos secundarios se forman en cantidades muy pequeñas (alrededor de 0,1% del peso de la planta) y cumplen funciones de defensa para la planta, frente a agresiones del ambiente. Por ello, sus cantidades pueden variar según las condiciones externas de la planta, como el clima, la estación del año, humedad, temperatura, etc.

Hota 2007, describe tres rutas biosintéticas que dan lugar a los diferentes metabolitos secundarios:

1. *Vía del aceil CoA o de los poliacetatos*: son aquellos que tienen como precursor al acetil CoA producto de la glicólisis de monosacáridos, aquí se forman compuestos de naturaleza lipídica, como ácidos grasos, así como los formados por condensación de cadenas policetónicas que dan origen a metabolitos policíclicos aromáticos como por ejemplo heterósidos antraquinónicos.
2. *Vía del ácido shikímico*: aquí se forman metabolitos secundarios con anillos aromáticos, normalmente polifenólicos, la mayoría de ellos se forman a partir de ácido cinámico. Un ejemplo de ello son los taninos con propiedades astringentes y las cumarinas utilizadas como anticoagulantes. También los flavonoides y antocianos que se los llama metabolitos mixtos porque una parte de sus moléculas se biosintetiza por la vía del ácido shikímico y otra parte por la vía de los poliacetatos. Además el ácido shikímico se forma a partir de monosacáridos.
3. *Vía del ácido mevalónico*: aquí se forman las moléculas que incorporan unidades isoprenicas, formando así metabolitos de naturaleza esteroidea como los heterósidos cardiotónicos, derivados isoprenicos, saponósidos triterpénicos o esteroídicos que son

considerados como antiinflamatorios y expectorantes, además el taxol que es un conocido antitumoral diterpeno nitrogenado, los iridoides y los isoprenoides (aceites esenciales). El ácido mevalónico es un precursor biogenético que se origina a partir del acetyl CoA.

1.4 La familia Annonaceae

La Annonaceae es una familia de las Angiospermas del orden Magnoliales. Consta de 180 géneros con unas 2400 especies que se distribuyen por los trópicos del Nuevo y Viejo mundo, hasta el norte de Australia y las islas del Pacífico y mayoritariamente en el pantropical (Chatrou y col., 2012; Mass y col., 1994). Se reportaron para Colombia alrededor de 240 especies pertenecientes a 30 géneros (Murillo, 2001), mientras que en Brazil 385 especies de las cuales 158 son endémicas y la mayor parte encontradas en la Amazonía (Lobao y col., 2012). Esta familia fue catalogada por primera vez por Jussieu en 1798 (Hutchinson, 1974). Los metabolitos secundarios con actividad biológica mas importantes aislados en la familia Annonaceae son: alcaloides isoquinolínicos, flavonoides C-metilados y C-bencilados y nitrofeniletanos; diterpenos, bencilbenzoatos, estirilpironas; policetidos, lignanos y acetogeninas; además, triterpenoides tetra y penta cíclicos (Leboeuf y col., 1980). Almeida y colaboradores en el 2012 reportaron la presencia de terpenos (diterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos) y alcaloides como isoquinolina en el aceite esencial que podrían tener significancia económica y dar utilidad en la industria a sus flores, frutos y semillas. Además algunos miembros de esta familia son usados en medicina tradicional desde hace muchos años para tratar parásitos, insectos y migrañas (Coria y col., 2016; Nigieffu y col., 1976).

Los estudios fitoquímicos en especies de esta familia se han incrementado en los últimos 10 años y se han centrado en la búsqueda de alcaloides, siendo aproximadamente 800 de éstos de tipo azafluorenonas, monoterpenos, triterpenos y *bis*-dehidroaporfina han sido encontrados y se

encuentran en mayor cantidad en estas plantas. Los miembros de esta familia presentan un amplio metabolismo, con compuestos no alcaloides en menor proporción, pertenecientes a varios grupos fitoquímicos y que deberían ser estudiados, como por ejemplo las bisbenzilisoquinolinas, flavonoides, lignanos, acetogeninas y otros compuestos aromáticos que podrían tener actividades interesantes (Carneiro y col., 2015).

Se le atribuyen importantes propiedades terapéuticas a esta familia de plantas como por ejemplo antimalárica, citotoxicidad contra varias líneas celulares de tumores, antimicrobiana, antioxidante y antiparasitaria (Tsabang y col., 2012; Preedy, 2016).

1.4.1 El género *Oxandra*

Oxandra es un género donde se han encontrado 10 especies en la región neotropical; sólo existen informes de 5 especies, y se han encontrado alcaloides tipo bis-dehidroaporfinas (Arango y col. 1987a), azafluorenonas (Arango y col., 1987b; Zhan y col., 1987), monoterpenos (Hocquemiller y col., 1991) y triterpenos (Winston & Lynn, 1992). Según su descripción macroscópica son arbustos o árboles, con hojas membranáceas, cartáceas a subcoriáceas, el nervio principal plano, impreso o elevado en el haz; flores pequeñas, axilares, solitarias o en inflorescencias de pocas flores, pedicelos ligeramente articulados por encima de la base, con 2 ó 3 brácteas basales y dísticas por debajo de la articulación; sépalos 3, imbricados, connados en la base; pétalos 3, imbricados, delgados, subiguales, ovados o linear-oblongos, blancos o verdosos, las márgenes frecuentemente ciliadas; estambres 6–20, el conectivo prolongados en un apéndice deltoide a lanceolado-ligulado; carpelos (1-)4–13, óvulo 1, basal, erecto. Monocarpos abayados, elipsoides, ápice redondeado, casi sésiles a cortamente estipitados; 1 semilla elipsoides, sin arilo (Gottsberger, 1999).

Oxandra cf. major contiene grandes cantidades de alcaloides 7,7'-bisdehydroaporfina, esteroides como la reticulina, aporfinoides y los nuevos azafluorenonas como darienina,

macondina y ursulina (Arango y col., 1987b; Zhan y col., 1987). Además a partir de *Oxandra espintana* se han aislado 4 monoterpenos, entre ellos el espintanol el cual posee actividad antiparasitaria *in vitro* contra 20 cepas de *Trypanosma* y 12 cepas *Lisbmania spp* (Hocquemiller y col., 1991). También de las hojas de *Oxandra sessiliflora* R. E. Fries, se han aislado terpenos como (E)-fitol y spathulenol, entre otros, y esteroides como campesterol, sitosterol y estigmasterol (Sousa y col. 2014). Se conocen triterpenos encontrados a partir de hojas de *Oxandra asbeckii*, y a partir del extracto de esta planta se probó la inhibición de la corrosión producida por ácido clorhídrico 1M en acero C38 resultando actividad anticorrosiva positiva al aumentar la concentración de extracto (Lebrini y col., 2011).

En cuanto a su uso etnomédico, se destaca *Oxandra lanceolata* (Sw) Bail utilizándose el cocimiento de cáscara como antiinflamatoria, antiséptica y antiespasmódica (Scull Lizama y col., 1998). También la misma especie ha sido descrita en la flora autóctona de Cuba como empleada tradicionalmente para tratar catarros (Hernández y col., 2004).

1.4.2 *Oxandra xylopioides*

De la especie *Oxandra xylopioides* Diels se han aislado solamente alcaloides de tipo azafluorenonas (Zhan y col., 1987). Esta especie posee pocos metabolitos secundarios, pero en grandes cantidades. En el extracto hexánico de hojas se aisló el monoterpenoide **isoespintanol** con un 1.5% en base seca; también el berenjenol o 21:24-epoxi-24-metil-cicloartano a partir del extracto de diclorometano, este último presentó actividad insecticida contra el gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* y actividad antiinflamatoria aguda en el test de carragenina, pero no efectos citotóxicos frente a macrófagos murinos RAW 264.7 (Rojano y col., 2007a; Rojano y col., 2007b).

1.5 Principios activos de interés biológico en esta tesis

1.5.1 Isoespintanol y sus derivados

El isoespintanol o 2-isopropyl-3,6-dimetoxi-5-metilfenol, representado en la Figura 1, es un monoterpene sólido, incoloro y cristalino de peso molecular 210 g/mol aislado del extracto hexánico de hojas de *Oxandra cf. xylopiodes* (Annonaceae). Eludido con mezclas de hexano y recristalizado con hexano presentó un rendimiento de 1.5%. Para establecer la estructura del isoespintanol y conocer los puentes de hidrogeno característicos de los grupos hidroxilos y sus respectivas interacciones, los cuales son muy importantes en los diferentes mecanismos oxidativos, se realizaron experimentos de difracción de rayos X de cristales. Resultó que en el cristal las moléculas se arreglan formando dimeros centrosimétricos formando enlaces de hidrogeno entre los grupos hidroxilo y los metoxilos del C-6. Adicionalmente, se encuentra un puente de hidrogeno muy débil entre los mismos grupos. Estas características cristalinicas estructurales del isoespintanol, permiten comprender muchos fenómenos donde participa el enlace O-H (Rojano, Tesis doctoral, 2007).

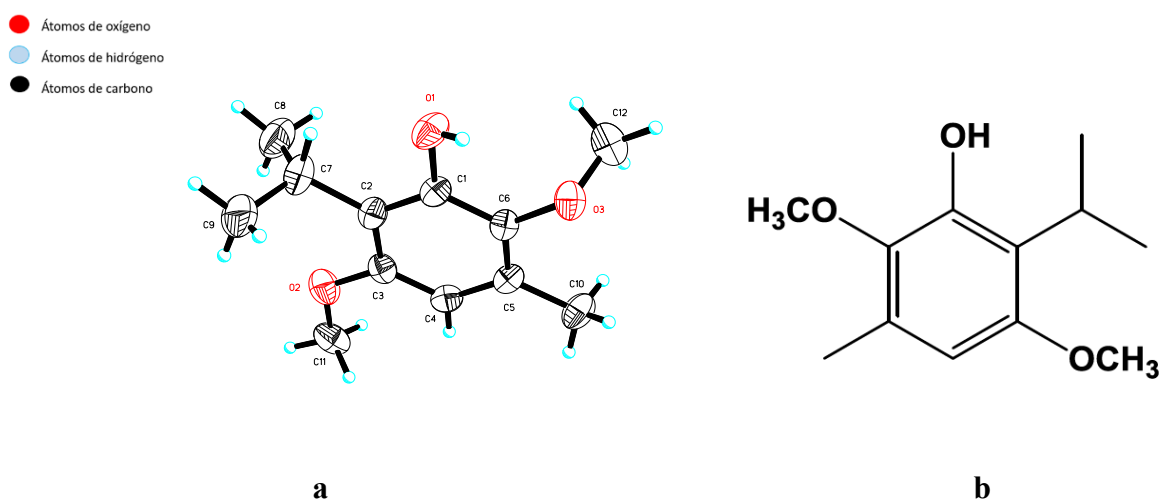


Figura 1. Estructura por rayos X (a) y estructura química del isoespintanol (b).

El isoespintanol demostró tener actividad antiinflamatoria (Rojano y col., 2007a) y antioxidante (Rojano y col., 2007b). Esta propiedad fue atribuida a los sustituyentes y a las interacciones inter e intramoleculares de hidrógeno (Rojano y col., 2008).

Al ser un benceno pentasustituído se lo anticipó como un sustrato recalcitrante por su sustitución aromática electrofílica como cualquier reacción de este tipo que podría terminar con anillo benceno sustituido completamente. Al inicio se trató de introducir grupos nitro, pero no se logró. Al final la introducción de otros sustituyentes en el anillo aromático o la desprotección de los grupos metoxi surgieron como una buena estrategia para mejorar la actividad antioxidante de la molécula de isoespintanol. Después de realizar la síntesis de dos compuestos hemisintéticos del isoespintanol como se muestra en la Figura 2, 4-bromo-2-isopropil-3,6-dimetoxi-5-metilfenol (**bromuro de Isoespintanol**) y 3-isopropil-6-metilbenceno-1,2,4-triol (**isoespintanol desmetilado**) y realizarse la pruebas antioxidantes respectivas se concluyó que estos dos compuestos poseen actividad antioxidante menor que la del isoespintanol en ensayo ABTS y DPPH (Rojano y col., 2007a; Rojano y col., 2007b; Rojano y col., 2008; Galeano y col., 2010).

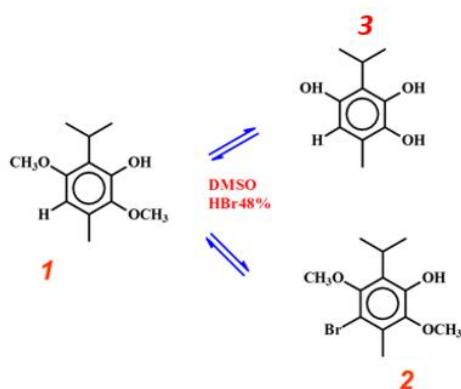


Figura 2. Brominación (2) y demetilación (3) de isoespintanol (1) con HBr/DMSO.

1.5.2 Análogos estructurales del isoespintanol

Estructuralmente el ISO posee similitud con el compuesto fenólico floroglucinol (1,3,5-trihidroxibenceno) y con su derivado metoxilado (1,3,5-trimetoxibenceno), como se muestra en la Figura 3. Estos dos compuestos son empleados en terapéutica asociados en formulaciones orales e inyectables, para tratar espasmos biliares, urinarios y uterinos, generalmente en caso de cálculos (Boukef y col. 2010; Laboratorios Elea, 1996).

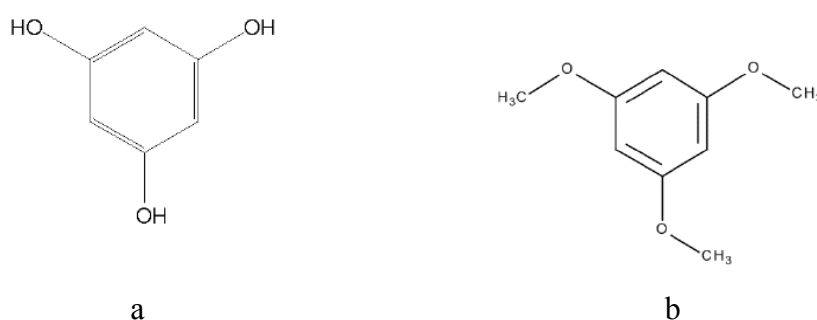


Figura 3. Estructuras químicas del Floroglucinol (a) y 1,3,5-Trimetoxibenceno (b)

Este tipo de estructuras constituyen una alternativa interesante para tratar situaciones de espasmo visceral para lo cual la estrategia terapéutica actual es la de optar por derivados atropínicos como la hioscina. Los medicamentos tipo atropina (derivados del tropano) presentan efectos colaterales antimuscarínicos varios, como la taquicardia y la sequedad bucal (xerostomía) debida a disminución de la secreción salivar y sequedad de la mucosa bronquial con posibilidad de tos, por lo que son deseables las alternativas terapéuticas más seguras (Boukef y col. 2010).

1.5.2.1 Floroglucinol

Floroglucinol (1,3,5-trihidroxibenceno) (Phg), es un polifenol constituido por un anillo aromático con tres grupos hidroxilos fenólicos (Figura 3). Se aisló por primera vez a partir de

algas pardas (*Phaeophyceae*). Puede encontrarse libre o polimerizado en forma de fluorotaninos, que son compuestos fenólicos conocidos en algas y en altas cantidades en las plantas (Bae, 2011; Quéguineur y col., 2012).

En la actualidad el Phg se produce como una droga sintética y tiene propiedad espasmolítica y antioxidante. Es empleado como tratamiento primario de cólicos gastrointestinales, con débiles propiedades anticolinérgicas, y actúa selectivamente sobre las fibras musculares lisas sobre un estado de espasmo. Entre los estudios experimentales, este compuesto no relajó al cuerpo cavernoso de ratas normales ni de las diabéticas cuando se precontracturaron con 3 μ M de fenilefrina, pero por su capacidad de inhibir al citocromo CYP3A4 al asociarlo con sildenafil aumentó la relajación potenciando su efecto (Dellabella y col., 2005; Goswami y col., 2016; Zhuang y col., 2003). En un estudio realizado por Dellabella y col. (2005), se sugirió que el uso prolongado de floroglucinol podría tener un impacto en el alivio del dolor producido por espasmos uretrales, ayudando también a la expulsión de cálculos renales a través del uréter.

1.5.2.2 Trimetoxibenceno

El trimetoxibenceno (TMB) es un compuesto derivado del floroglucinol que posee los grupos fenólicos metoxilados (Figura 3), con el objetivo de prolongar la acción del compuesto. Tiene iguales propiedades farmacológicas, diferenciándose sólo en la potencia y duración del efecto (Laboratorios Elea, 1996).

1.6 Bases para el estudio de las propiedades antiespasmódicas

1.6.1 Características contráctiles del músculo liso

El tejido muscular consiste esencialmente en un conjunto de células o fibras alargadas que desarrollan una función contráctil debido a la presencia de miofilamentos de actina y miosina. El cuerpo humano tiene tres clases de tejido muscular, el cardíaco, el esquelético y el liso, que difieren en ubicación, estructura, función y en el mecanismo regulador de la contracción. Los músculos esquelético y cardíaco se consideran de tipo estriado debido a la regularidad de sus miofibrillas, lo cual se detecta al microscopio electrónico. En cambio, el músculo liso es no estriado, debido a que sus miofibrillas no son regulares, sino que forman agrupamientos irregulares, no visibles por técnicas microscópicas. Otra diferencia importante es que la regulación de la contracción es disparada por el ión calcio (Ca^{2+}) en todos los tipos de músculos, pero mientras en el esquelético y en el cardíaco la proteína fijadora del Ca^{2+} es la troponina, en el músculo liso es la calmodulina. Además, todas las células musculares o miocitos pueden ser consideradas funcionalmente una única unidad, por lo que pueden evaluarse las funciones y efectos de fármacos tanto en órganos aislados como en tejidos y en miocitos aislados. Similarmente al músculo cardíaco, en el liso los miocitos responden individualmente y contribuyen a propagar el estímulo a miocitos vecinos, mediante conducción del ión K^+ por uniones de baja resistencia eléctrica. Esto genera una respuesta propagada y coordinada al unísono en el conjunto de células, a modo de un sincicio. Una característica especial del tejido muscular consiste en acortar y desarrollar la tensión ante la excitación con un estímulo umbral, seguido por la subsecuente relajación al tamaño y tensión originales.

El ***músculo liso*** se encuentra constituyendo los órganos internos y vísceras como son el estómago, útero, bronquios, vejiga y vasos sanguíneos. Su función principal es influir en el movimiento del material que contienen hacia el interior o exterior del cuerpo. Las fibras del músculo liso están dominadas por el sistema nervioso autónomo, con acciones generalmente opuestas de las ramas simpática y parasimpática. A diferencia del músculo liso de los vasos en los cuales el tono es aumentado por el simpático, en las vísceras la estimulación simpática induce

relajación mientras la contracción depende del sistema parasimpático. Estas acciones son reproducidas en los preparados aislados por agentes químicos como la acetilcolina y la adrenalina (Silverthorn, 2008).

1.6.2 Mecanismo general de contracción y relajación del músculo liso

El activador de la contracción es el ión calcio (Ca^{2+}), que puede ingresar del medio extracelular a través de los canales de tipo L voltaje-dependientes y conocidos como canales sensibles a las dihidropiridinas (DHP) que pueden bloquearlos competitivamente con el Ca^{2+} . A diferencia de los otros tipos de músculo, el liso tiene muy escaso o nulo reservorio de Ca^{2+} en depósitos intracelulares, siendo nulo en vísceras y escaso en arterias como la aorta. Para iniciar el influjo de Ca^{2+} , el músculo liso puede responder a dos tipos de estímulo: un potencial de acción (sólo en músculos lisos con actividad eléctrica de membrana), o la unión de un neurotransmisor o un fármaco agonista a un receptor acoplado a una proteína Gq (en todos los tipos de músculos lisos). Dependiendo del músculo liso serán diversos los receptores acoplados a proteína Gq que pueden desarrollar la contracción, como se verá en los puntos siguientes. La cascada de segundos mensajeros intracelulares se inicia con la activación del receptor acoplado a una proteína Gq que cataliza la hidrólisis de GTP y la activación de la fosfolipasa C (PLC). Esta enzima cataliza la conversión de los fosfatidilinositoles de membrana (PIP_2) en inositoltrifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG). El IP_3 estimula la apertura de canales de Ca^{2+} del retículo endoplasmático, pero este aporte es minoritario en músculos con escaso reservorio intracelular. El DAG activa a una proteína-quinasa C (PKC) encargada de fosforilar y con ello aumentar la posibilidad de apertura de los canales de Ca^{2+} tipo L, facilitando así el influjo (Rang y col., 2008; Brunton y col., 2014).

La contracción del músculo liso se inicia ante un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ desde el nivel de reposo de $0.1 \mu\text{M}$ hasta $10 \mu\text{M}$. El Ca^{2+} se une a una proteína citosólica llamada calmodulina y se

forma el complejo Ca-calmodulina. Este complejo estimula la actividad enzimática de la quinasa de la cadena liviana de la miosina (KCLM) la cual fosforila a dicha cadena (CLM). Esta reacción provoca la interacción de la miosina con la actina, acoplada a la reacción exotérmica de hidrólisis del ATP, que libera la energía necesaria para el proceso contráctil. Cuando la $[Ca^{2+}]_i$ desciende nuevamente a $0.1 \mu M$ el complejo Ca-calmodulina-KCLM se disocia, y comienza a predominar la acción de una fosfatasa. Esta enzima desfosforila la cadena liviana de miosina, produciéndose así la relajación.

El descenso de la $[Ca^{2+}]_i$ es debido al predominio de los mecanismos de remoción de Ca^{2+} citosólico por sobre los mecanismos de influjo de Ca^{2+} al citosol. Entre estos mecanismos se destaca el intercambiador Na^+/Ca^{2+} que es un transporte activo secundario electrogénico, que facilita el eflujo de 1 Ca^{2+} y el influjo de 3 Na^+ y está conducido por el gradiente de Na^+ establecido por la Na, K-ATPasa. Otro transporte de eflujo de Ca^{2+} son las Ca-ATPasas que hidrolizan primariamente ATP.

Alternativamente, existe otro mecanismo de relajación, que está activo aún en presencia de Ca^{2+} citosólico. Depende de una regulación de las proteínas contráctiles por los niveles de nucleótidos cíclicos, tal que un aumento en el nivel de AMPc activa a una proteína quinasa A (PKA), y ésta cataliza la fosforilación de la quinasa de la cadena liviana de miosina (KCLM). La KCLM tiene poca afinidad por el complejo Ca-calmodulina por lo que la relajación se ve favorecida por la predominante actividad de la fosfatasa. El aumento del AMPc se puede originar por la activación del receptor β_2 -adrenérgico activado por catecolaminas o por la inhibición de la fosfodiesterasa (PDE) enzima que degrada el AMPc a 5'-AMP (Brunton y col., 2014).

La Figura 4 resume este conjunto de mecanismos de contracción y relajación del músculo liso.

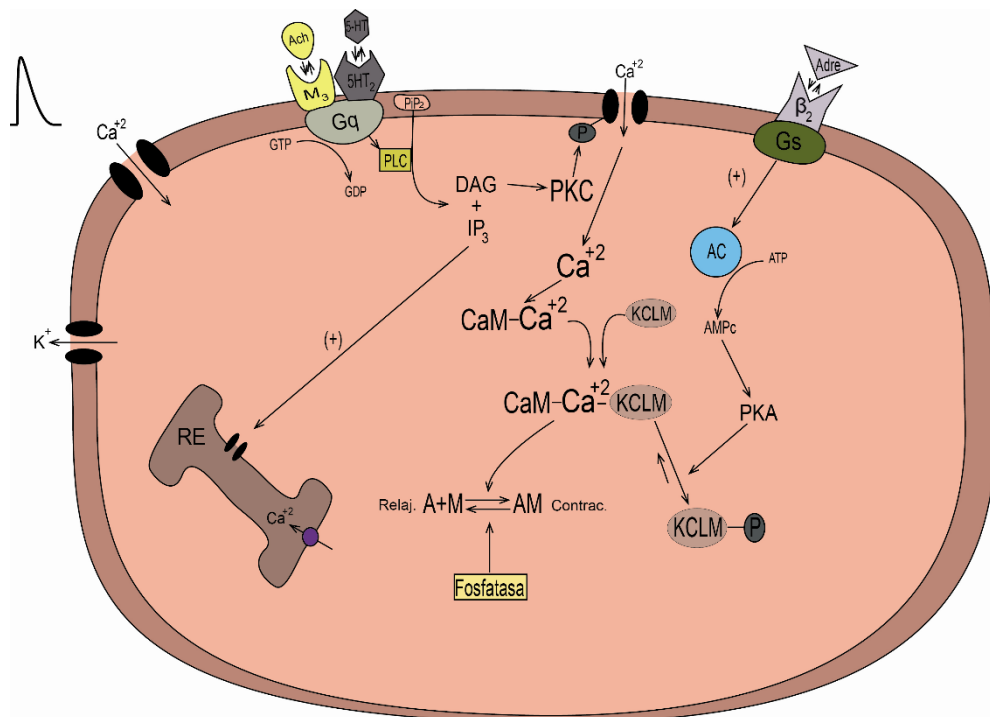


Figura 4: Mecanismo general de contracción-relajación de músculo liso visceral. La contracción puede ser disparada por un potencial de acción en espiga (izquierda) o por la estimulación de receptores muscarínicos (M3) y de serotonina (5-HT₂). La relajación puede dispararse por remoción del Ca²⁺ citosólico, o por activación del receptor β₂-adrenérgico.

1.6.3 Intestino

El duodeno y el íleon de rata constituyen un modelo para estudiar los efectos gastrointestinales antiespasmódicos de fármacos y extractos de plantas. El intestino posee una capa muscular circular interna y otra capa de fibras longitudinales presentes en la superficie externa del intestino. Pero en la mayoría de los experimentos que utilizan preparados aislados de intestino se evalúan los efectos sobre la fuerza de contracción de la capa muscular longitudinal, porque el preparado se cuelga en esa dirección, manteniendo el tubo intestinal abierto para la circulación del medio oxigenado. Los receptores muscarínicos M1, M2 y M3 que se encuentran presentes en el músculo liso gastrointestinal permiten estudiar los efectos y mecanismos

antiespasmódicos directos en el músculo o en la estimulación colinérgica (Karamenderes y Apaydin, 2003; Emendorfer y col., 2005; Brunton y col., 2014). El sistema nervioso entérico está formado por neuronas integradas en ganglios entéricos conectados entre sí y localizados mayormente en el plexo mientérico (ME), con algunas aferentes primarias llegando al plexo submucoso (SM). En los ganglios hay receptores nicotínicos (Ng) para la acetilcolina. Las fibras simpáticas también inervan el intestino, fundamentalmente por terminales noradrenérgicas que llegan a los plexos. La NA liberada puede actuar en receptores alfa-2 (α_2) ubicados presinápticamente en las terminales colinérgicas, por lo cual inhibe la liberación de acetilcolina. Otros neurotransmisores liberados en el plexo de Auerbach y Meissner que tienen receptores en el intestino delgado de rata son: dopamina actuando en receptores D1 y D2 para generar un efecto relajante, serotonina en receptores 5-HT₂ dando un leve efecto constrictor y 5-HT₄ estimulando la liberación de Ach, neurotransmisores inhibitorios como óxido nítrico (NO) y péptido intestinal vasoactivo (VIP), y encefalinas y endorfinas actuando en receptores μ presinápticos para inhibir la liberación de otros neurotransmisores (Brunton y col., 2014; De Carvalho y col., 2014).

Los movimientos peristálticos intestinales son miogénicos y principalmente accionados por reflejos locales. El movimiento pendular es el único que perdura en el intestino una vez aislado, y se debe a una actividad eléctrica marcapaso con localización oscilante en el músculo, que genera pulsos de despolarización. Estas ondas, comúnmente conocidas como espigas, activan canales de Ca^{2+} tipo L que desencadenan el tono basal y contracciones pendulares. Las células marcapaso especializadas del tracto gastrointestinal son denominadas células intersticiales de Cajal (CIC), aunque hay evidencias de células tipo CIC que juegan un rol similar en otros tipos de músculo liso (como uretra, vejiga y útero). En intestino están adheridas por debajo de la capa del músculo liso longitudinal. Recientes resultados sugieren que las oscilaciones de $[\text{Ca}^{2+}]$ en células

intersticiales uretrales de conejo aislado son iniciadas por liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares sensibles a ryanodina, que la frecuencia de oscilación es muy sensible a la concentración externa de Ca^{2+} , y que la conversión de la oscilación primaria a las ondas de Ca^{2+} propagadas dependen de la liberación de calcio inducida por IP_3 (McHale y col. 2006).

1.6.4 Vejiga

Las funciones fisiológicas de la vejiga urinaria son almacenar y liberar periódicamente la orina, facilitando la contracción y relajación del músculo liso detrusor que es el que determina la pared de la vejiga (Andersson & Arner, 2004). El trigono hace las veces de esfínter, permitiendo la salida de la orina hacia la uretra y los uréteres. Ambos tipos de músculos lisos reciben una regulación externa a cargo del sistema nervioso autónomo, que mediante las ramas parasimpática y simpática dispara simultáneamente la contracción del detrusor y la relajación del trigono para promover la micción, o los efectos opuestos durante los períodos de llenado de la vejiga. Por lo tanto, en el preparado de vejiga urinaria aislada la contracción puede ser iniciada por la estimulación del nervio parasimpático, lo cual se logra mediante la estimulación de campo de los nervios intrínsecos del músculo liso del detrusor. La acetilcolina (Ach) es el neurotransmisor liberado en los axones del nervio intramural de la vejiga urinaria (Kura y col., 1992) y es el principal responsable de la contracción fisiológica de la vejiga por activación de receptores muscarínicos M3 en el detrusor, aunque la neurotransmisión purinérgica (ATP) también puede contribuir a la contracción fásica inicial del músculo liso del detrusor (Andersson, 2003; Andersson, 2004). La fase contráctil inicial (o contracción fásica) es inducida por el transmisor ATP, que activa receptores de tipo purinérgico P2Y que desencadenan la formación de IP_3 y DAG, induciendo respectivamente la liberación transitoria de Ca^{2+} intracelular y el influjo de Ca^{2+} por canales L. La fase estable (contracción tónica) es debida a la acetilcolina que estimula receptores M3. La contracción fásica inicial es fuertemente resistente a atropina pero es suprimida

por los antagonistas de calcio, y la contracción tónica es suprimida por atropina y por oxibutinina. Además las fibras aferentes que alcanzan el espacio suburotelial e incluso el urotelio son responsables de transmitir los estímulos de presión por llenado de la vejiga, los cuales disparan la contracción del detrusor en el reflejo de micción (Fry y col., 2004).

Una patología frecuente en adultos es la urgencia miccional, producida en general por una hiperactividad del detrusor, que posee un estimulado peristaltismo. La disminución del tono y la amplitud normal de las contracciones en vejiga y uréter son producidas por los antagonistas muscarínicos como la oxibutinina, los cuales no están exentos de efectos adversos debidos a la acción en otros tejidos. Los receptores M2 son lo que prevalecen en la vejiga, aunque estudios demuestran que los M3 producen la contracción del detrusor, mientras que el M2 vía inhibición de la adenil-ciclasa (AC) producen contracción en el músculo liso indirectamente al inhibir los receptores β -adrenérgicos que producen relajación. Otros mecanismos de los receptores M2 pueden ser la activación de canales catiónicos no específicos y la inactivación de canales de potasio (Hegde y Eglen, 1999; Brunton y col., 2014).

La adrenalina relaja al músculo detrusor de la vejiga por activación de los receptores β_2 , que activan a la adenil-ciclasa, mientras que a los músculos del trigono y esfínter los contrae por su actividad agonista α_1 adrenérgica (Brunton y col., 2014).

El detrusor posee una gran variedad de canales de K^+ que determinan la excitabilidad y contractilidad. Estos canales regulan con precisión y ajustan la entrada de Ca^{2+} a través de los canales tipo L dependientes de voltaje, y consecuentemente la concentración de Ca^{2+} intracelular controla la contracción y relajación en el detrusor. Estudios sugieren que los canales de K^+ expresados en células intersticiales podrían tener un papel fundamental en la determinación del patrón de actividad eléctrica espontánea y contráctil del detrusor (Hashitani y col., 2004). Además los canales de K^+ activados por Ca^{2+} (K_{Ca}) han presentado un papel importante en el control de la función de la vejiga y se han propuesto como terapia para aumentar la actividad de la vejiga. Estos

canales presentan tres subtipos con diferente capacidad de conductancia, los de gran conductancia o “*big channels*” (BK; MaxiK), los de conductancia intermedia (IK) y los de corta conductancia denominados SK que incluyen SK1, SK2 y SK3. La supresión de SK3 produce hiperactividad de la vejiga mientras que el efecto contrario es producido por su sobreexpresión (Petkov, 2011; Herrera y col., 2003; De la Fuente y col., 2014). Los canales BK controlan la excitabilidad y contractilidad del detrusor, manteniendo el potencial de reposo (E_m) y dando forma a la fase de repolarización de los potenciales de acción espontáneos que determinan la automaticidad o ritmo contráctil espontáneo. En el detrusor estos canales tienen complejos mecanismos regulatorios que involucran señales integradas de Ca^{2+} intracelular, proteinquinasas, fosfodiesterasas, y estrechas interacciones funcionales con los receptores muscarínicos y los β -adrenérgicos. En algunas patologías de la vejiga como la hiperactividad del detrusor está implicada una alteración del canal BK (Petkov, 2011). Además, en las contracciones fásicas disparadas por estimulación eléctrica de campo participan canales de K^+ dependientes de ATP (KATP). El abridor de canales KATP pinacidilo provoca relajación y reducción de la frecuencia peristáltica del detrusor, lo cual es sensible a glibenclamida, un inhibidor de los KATP (Philyppov y col. 2016).

1.6.5 Útero

El útero tiene inervación autonómica tanto parasimpática como simpática, por lo cual tiene receptores alfa y beta adrenérgicos y muscarínicos. Los receptores M1 y M3 están acoplados a una proteína Gq y conducen al aumento del influjo de Ca^{2+} a la célula muscular lisa, por lo cual el parasimpática aumenta el tono uterino. Para varios de los receptores, este tipo de músculo liso presenta una respuesta que varía entre especies y con el estado gestacional, predominando especialmente los receptores α -adrenérgicos en el útero no gestante, que generan aumento del tono del músculo liso, y los β_2 -adrenérgicos en el útero gestante que inducen relajación. Además, el útero tiene receptores para las prostaglandinas (PG) y para la serotonina (5-HT), siendo las

primeras los autacoides inductores de las contracciones que disparan el parto. Hay un período latente luego de la adición de un agonista hasta que se inicia la contracción, la respuesta es todo o nada, y la contractura no se mantiene aún cuando permanezca el agonista en el medio, a diferencia de aorta e intestino. Esto es debido a que el útero posee una actividad espontánea en ondas de gran amplitud.

Las ondas espontáneas se asocian a despolarizaciones, las cuales se reducen durante el embarazo. La despolarización es provocada por la activación de canales de calcio tipo L (L-Ca), y la relajación es provocada por la inactivación de los mismos canales y por la activación de varias clases de canales de potasio, lo cual provoca repolarización o hiperpolarización. Los que se encuentran en el útero son los canales de K^+ activados por Ca^{2+} de gran conductancia (BK_{Ca}), los canales de K^+ sensibles a ATP (K-ATP), y por lo menos un tipo de canal de K^+ rectificador hacia el interior (Smith y col. 2007).

Los canales de potasio dependientes del voltaje (K_v) y los canales de potasio de larga conductancia activados por calcio (BK_{Ca}) presentes en el miometrio de rata juegan un papel importante en las contracciones del útero. Principalmente los canales K_v participan en la regulación de la actividad espontánea contráctil en el miometrio de rata. Los bloqueantes de los canales K_v producen contracciones en ratas no preñadas, pero este efecto desaparece en ratas preñadas, mostrando que la fase de hiperpolarización y relajación se atenúa durante el embarazo. En cambio, los bloqueantes selectivos de los canales BK_{Ca} no inducen grandes cambios, concluyéndose que estos canales no juegan un papel importante controlando el ritmo basal en el miometrio de rata (Smith y col., 2007; Aaronson y col., 2006). La actividad rítmica espontánea puede reducirse en los preparados aislados empleando la temperatura de 32-34°C y una baja concentración de calcio extracelular (0.6 mM en el medio de Jalon).

La serotonina ejerce una acción estimulante a nivel uterino, al igual que en el intestino pero con mayor intensidad. Actúa en los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C}, acoplados a una proteína

Gq y al aumento de los niveles de fosfolipasa C (PLC) y fosfolipasa A2 (PLA2). La fosfolipasa cataliza la formación de inositol-3-fosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG), y éste último activa a la proteínaquinasa C (PKC), por lo cual los dos segundos mensajeros incrementarán el influjo de Ca^{2+} al citosol (Brunton y col., 2014).

En la estimulación adrenérgica, están presentes los receptores β_2 cuya activación produce relajación, y fisiológicamente están estimulados por la adrenalina circulante. Los receptores adrenérgicos predominantes en útero son los α_1 que producen contracción en embarazo, mientras los β_2 lo relajan, tanto en presencia como en ausencia de embarazo. Por otra parte, en el embarazo los receptores muscarínicos y sus efectos son variables (Brunton y col., 2014).

La acción de la adrenalina depende de la especie, dosis y estado gestacional. En el humano contrae el músculo liso del útero gestante o no gestante *in vivo* debido a los receptores α_1 , pero en el preparado *ex vivo* estos efectos varían. Además, en el último mes del embarazo y en el momento del parto la adrenalina inhibe las contracciones y el tono muscular por su acción β_2 . Es por ello que dos fármacos que son agonistas β_2 adrenérgicos como la ritodrina y la isoxuprina se emplean para demorar las contracciones prematuras (Brunton y col., 2014).

1.7 Actividad citotóxica del isoespintanol y sus derivados

La citotoxicidad es una alteración de las funciones básicas que conlleva a que se produzca la muerte celular que puede ser apropiada o inapropiada. Una muerte celular apropiada en la mayoría de los casos es programada y ocurre por apoptosis. El programa de apoptosis, incorporado en el material genético de cada célula, sólo se activa en aquellas destinadas a morir en cierto punto. Lejos de ser dañina, la apoptosis es esencial para un desarrollo adecuado. En contraste, la muerte celular inapropiada es la destrucción no anticipada de la célula, la cual no estaba destinada a morir en condiciones normales. La muerte celular inapropiada puede tener múltiples formas, con

características necróticas y apoptóticas. Aunque la necrosis es la forma más característica, también el inicio erróneo de la apoptosis en condiciones anormales o estresantes resulta en el detrimento del organismo (Sastry & Rao, 2000).

Las células pueden sufrir ya sea necrosis o apoptosis en respuesta a estímulos diferentes, o un mismo estímulo puede generar apoptosis o necrosis dependiendo de su intensidad (Leist & Jaattela, 2001; Nicoreta y col., 1999).

Históricamente, la apoptosis y la necrosis han sido consideradas como las dos formas fundamentales de muerte celular. Sin embargo, evidencias recientes sugieren que la muerte celular programada no está confinada sólo a la apoptosis sino que las células disponen de distintos mecanismos de autodestrucción, entre los que se cuenta la autofagia (Aránguiz, 2006).

La autofagia es un proceso dinámico y programado que procede con el secuestro de proteínas citoplasmáticas y organelos enteros dentro de vacuolas de doble membrana, que se contactan y se fusionan con los lisosomas, formando los autolisomas. Los elementos capturados en las vacuolas son degradados por proteasas lisosomales y removidos de la célula por exocitosis. La autofagia se describió inicialmente como un proceso fisiológico clave para la sobrevivencia celular en respuesta al estrés derivado de la privación de nutrientes (Aránguiz, 2006).

En la necrosis las células se hinchan, las mitocondrias y el retículo endoplasmático pierden su estructura y se vuelven disfuncionales. La muerte necrótica es independiente de proteínas apoptóticas premitocondriales tales como Bax, liberación de citocromo c y activación de caspasas. el mecanismo clave de la necrosis es el daño a la membrana celular (Buja y col., 1993).

Durante la necrosis las células sufren daños en la membrana celular, las mitocondrias y el retículo endoplasmático perdiendo su estructura y en consecuencia se vuelven disfuncionales (Buja y col., 1993).

La apoptosis es la muerte celular gobernada por un programa genético común en varios tipos celulares. Principalmente este mecanismo afecta más a células individuales que a todas las

que componen un tejido y se considera como un recurso del organismo para la remoción celular. (Kerr y col., 1972; Penninger & Kroemer, 1998).

La muerte celular programada puede activarse a través de la vía intrínseca o de la vía extrínseca, dependiendo del origen del estímulo de muerte. La vía extrínseca es mediada por la activación de receptores, los receptores de muerte más conocidos son el Fas y el TNFR1 (receptor TNF). Son proteínas transmembrana con sus dominios receptores expuestos en la superficie de la célula. La unión de un activador complementario o ligando, FasL y TNF (factor de necrosis tumoral), respectivamente, transmite una señal al citoplasma que conduce a la activación de la caspasa-8. La caspasa-8 inicia una cascada amplificadora de activación que conduce al desmantelamiento celular, a la formación de cuerpos apoptóticos y a la fagocitosis de la célula (Vandenabeele y col., 2006).

La vía intrínseca es desencadenada en respuesta a una amplia variedad de estímulos que son generados dentro de la célula, tales como activación de oncogenes o daño del ADN. Esta vía es mediada desde la mitocondria, y en respuesta a estímulos apoptóticos diversas proteínas son liberadas del espacio intermembranal de la mitocondria hacia el citoplasma. Algunas de las proteínas bien caracterizadas incluyen: el citocromo c, AIF (factor inductor de apoptosis), EndoG (endonucleasa G) entre otras. Quizá la más importante de estas proteínas proapoptóticas sea el citocromo c, el cual se une y activa a la proteína factor 1 activador de la proteasa apoptótica (Apaf-1) en el citoplasma, lo que promueve que esta última se una a ATP/dATP y forme el apoptosoma, que media la activación autocatalítica de caspasa 9 (3, 5, 6), y esta a su vez activa a la principal caspasa efectora, caspasa 3 (Vandenabeele y col., 2006).

La diferencia entre apoptosis y necrosis es que esta segunda se produce como resultado de una lesión física y traumática, las células generalmente mueren en masa, y en la apoptosis la muerte celular es de manera individual dentro de una población (Gleichmann y col., 2002).

1.7.1 Sistema inmune: nuevo paradigma para resolución del proceso inflamatorio

El sistema inmunológico se divide a menudo en dos subsistemas distintos pero interrelacionados, el sistema inmune innato y el sistema inmune adaptativo. El sistema inmune innato se caracteriza por tener tres funciones: defensa del huésped en las primeras etapas de la infección a través del reconocimiento inespecífico de un patógeno, inducción de la respuesta inmune adaptativa y determinación del tipo de la respuesta adaptativa. Las principales características de la inmunidad adaptativa son el reconocimiento específico del patógeno que conduce a memoria a largo plazo (Medzhitov & Janeway, 2000).

Estructuralmente, el sistema inmune esta constituido por una colección de células, moléculas, tejido, órganos y sistemas circulatorios. Las células del sistema inmune se producen y maduran en áreas especializadas del cuerpo llamadas órganos linfoides primarios tales como el timo o la médula ósea. Se transportan a través de los sistemas circulatorio cardiovascular y linfático a los tejidos periféricos o los órganos linfoides secundarios especializados tales como los ganglios linfáticos o el bazo. El sistema inmune adaptativo se organiza alrededor de dos clases de células: las células T y las células B, mientras que las células del sistema inmune innato son mucho más numerosas, incluidas las células polimorfonucleares, macrófagos, “natural killer”, entre otras (Farrell y col., 2012).

Actualmente, la respuesta del sistema inmunitario-inflamatorio se considera de modo global y coordinada planteándose con una visión más fisiológica del reconocimiento, la regulación y su ejecución. Tras la activación de las células del sistema inmune innato se producen y liberan mediadores inflamatorios y se incrementa la expresión de moléculas coestimuladoras y de adhesión que mediarán en la activación del sistema inmune adaptativo. El funcionamiento del sistema inmune, en su conjunto, resulta en la inflamación, local y/o sistémica, que en última instancia tiene como objetivo restaurar la homeostasis. Existe una estrecha relación entre la inflamación y la homeostasis (Maskrey y col., 2011).

Los neutrófilos humanos maduros tienen el período de vida más corto de todos los leucocitos, su apoptosis espontánea es fundamental para mantener un nivel normal de neutrófilos circulantes y asegurar una resolución rápida de las respuestas inflamatorias. No es sorprendente que una reducción de la apoptosis de neutrófilos se haya relacionado con varias afecciones inflamatorias, incluyendo artritis reumatoide y síndrome de dificultad respiratoria aguda (Hallett y col., 2008).

Los macrófagos son las células de inmunidad innata que se derivan de células madre hematopoyéticas de la médula ósea. Después de la diferenciación de las células madre hematopoyéticas en monocitos, se liberan de la médula ósea en la circulación. En el caso de la infección, los monocitos migran a los sitios inflamatorios locales, donde pueden diferenciarse en macrófagos. Una función clave de los macrófagos en estos sitios es proteger el cuerpo de la infección mediante la eliminación y la muerte de las células infectadas a través de fagocitosis y citoquinas, respectivamente. Los macrófagos también promueven la reparación de heridas y remodelación de tejido mediante la producción de matriz extracelular. Además del papel de los macrófagos en la inflamación clásica, también se cree que juegan un papel importante en la regulación de la inflamación crónica. En la mayoría de las enfermedades crónicas como la aterosclerosis y la Diabetes mellitus T2, los macrófagos producen quimiocinas que reclutan otras células inmunitarias en los sitios inflamatorios locales. También, son capaces de producir citoquinas pro-inflamatorias que polarizan y activan otras células inmunitarias (Meshkani & Vakili, 2016).

Un paradigma central de la investigación de la inflamación ha sido que la resolución de la inflamación depende de la apoptosis de células inflamatorias (por ejemplo, neutrófilos y eosinófilos) y su posterior eliminación por fagocitos especialmente macrófagos (Leitch y col., 2008).

La inflamación no controlada se aprecia ahora en la patogénesis de muchas enfermedades que no se consideraban anteriormente enfermedades inflamatorias clásicas. Estos incluyen aterosclerosis, cáncer, asma y varios trastornos neurológicos, como la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson (Serhan y col., 2008).

El término antiinflamatorio se aplica al medicamento o procedimiento médico usados para prevenir o disminuir la inflamación de los tejidos. Hay dos grandes grupos de fármacos antiinflamatorios: esteroideos y no esteroideos (AINES). También existe el grupo de fármacos antirreumatoides modificadores de la enfermedad (FARME) y algunos otros fármacos con propiedades leves antiinflamatorias como ciertos antihistamínicos y los usados para tratamiento de la gota aunque no son estrictamente antiinflamatorios (Rang y col., 2008).

Considerando las limitaciones de los fármacos disponibles para determinados procesos inflamatorios, durante los últimos años, se han propuesto algunas estrategias farmacológicas que podrían utilizarse para la resolución de la inflamación mejorando la apoptosis de las células polimorfonucleares sin afectar la función de los macrófagos.

Recientemente, se estudió la actividad apoptótica *in vitro* del isoespintanol (ISO) y dos derivados semisintéticos –bromuro de isoespintanol (BrI) e isoespintanol desmetilado (DMI) – en células polimorfonucleares humanas (PMN). Este estudio, demostró que el BrI, induce un proceso apoptótico en PMN y está mediado al menos en parte por la activación de las caspasas (Dade y col., 2016).

En atención a estos últimos resultados, se propuso en esta tesis la evaluación de la citotoxicidad de estos compuestos en macrófagos.

2. HIPÓTESIS

2.1 El isoespintanol posee una similitud estructural con los compuestos floroglucinol y trimetoxibenceno, y por tal razón podría generar actividad antiespasmódica como ellos.

2.2 La resolución de la inflamación provocada por el isoespintanol y sus derivados se debería a la inducción de la apoptosis de las células polimorfonucleares sin afectar la función de los macrófagos.

3. OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar las actividades antiespasmódicas intestinal, uterina y urinaria, y la actividad citotóxica del isoespintanol.

Objetivos específicos

- Evaluar la actividad antiespasmódica del isoespintanol en órganos viscerales aislados de rata: intestino, útero y vejiga.
- Estudiar los mecanismos de acción antiespasmódica del isoespintanol.
- Comparar los efectos antiespasmódicos del isoespintanol con los de los análogos estructurales floroglucinol y trimetoxibenceno.
- Examinar la citotoxicidad *in vitro* del isoespintanol y de dos derivados semisintéticos (bromuro de isoespintanol e isoespintanol desmetilado) en macrófagos murinos RAW 264.7.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1 Compuestos ensayados

Isoespintanol (ISO), pureza >99%, peso molecular 210 g/mol, previamente aislado del extracto hexánico de hojas de *Oxandra cf. Xylopioides* (Rojano y col. 2007).

Los dos derivados semisintéticos, bromuro de isoespintanol e isoespintanol desmetilado, ambos con pureza >99%, se obtuvieron a partir del isoespintanol como se describe en Galeano y col (2010). Los compuestos fueron aislados, sintetizados y provistos por el Prof. Dr. Benjamín Alberto Rojano de la Universidad Nacional de Colombia (Sede Medellín).

Floroglucinol (Phg) fue adquirido en Sigma-Aldrich Chemistry (USA), con pureza >99% (HPLC), peso molecular 126.11g/mol, fue disuelto en agua de acuerdo a las propiedades presentadas por el proveedor.

Trimetoxibenceno (TMB) fue adquirido en Sigma-Aldrich Chemistry (USA), con pureza >99%, peso molecular 168.19g/mol, y fue disuelto en DMSO, debido a que no es soluble en agua.

(+/-) Clorhidrato de Verapamil (Vpl), fue adquirido en ICN Biomedicals Inc., peso molecular 491.07 g/mol

Adrenalina (Adre), adrenalina inyectable “BIOL” adquirida en el Instituto Biológico Argentino S.A.I.C.

4.2 Preparación de las diluciones

Se obtuvieron las respectivas diluciones a partir del compuesto ISO en dimetil sulfoxido (DMSO) como solvente, obteniendo concentraciones desde 10 a 0.3 mM. Estas concentraciones se administraron en la solución Tyrode de las cubas en dilución 1/100 para los ensayos en intestino y vejiga (Hamada y col. 1997) y en solución Jalon para los ensayos en útero y obteniendo así una concentración final en cuba de entre 100 y 3 μ M.

Las diluciones del compuesto Phg fueron preparadas en agua destilada, obteniendo concentraciones (desde 30 a 0.1 mM en solución) para administrar en la solución Tyrode de las

cubas en dilución 1/100 para los ensayos en intestino, y en la solución Tyrode modificada para las pruebas en vejiga, obteniendo concentraciones finales en cuba de 300 a 1 μ M.

Las diluciones del compuesto TMB fueron preparadas en DMSO en concentraciones desde 30 a 0.1 mM en solución, para administrar en dilución 1/100 en la solución Tyrode de las cubas para los ensayos en intestino, y en solución Tyrode modificada en vejiga, para obtener concentraciones finales en las cubas desde 300 a 1 μ M.

Las diluciones de verapamilo fueron realizadas en agua destilada, obteniendo concentraciones desde 1 a 0.01 mM en solución para administrar en dilución 1/100 en la solución Tyrode modificada de las cubas para los ensayos en vejiga, obteniendo concentraciones finales en cuba de 10 a 0.1 μ M (Blanco y col., 2013).

Las diluciones para las curvas de relajación con Adre fueron disueltas en agua destilada, desde una concentración inicial de 1 a 1000 μ g/ml en las soluciones para diluir 1/100 al administrar en la solución Jalon para útero, obteniendo concentraciones finales de 10 ng/ml a 10 μ g/ml.

4.3 Animales

El manejo de animales de experimentación se realizó bajo los principios y normas internacionales (publicación del NIH #85-23 revisado en 1985). Se utilizaron ratas Sprague-Dawley de 200-250 g. mantenidas en el bioterio de la cátedra de Farmacología bajo condiciones controladas de 12 hs luz-12 hs noche, con 12 horas de ayuno y agua ad libitum. Los animales anestesiados con uretano (0,6 ml de solución al 25% cada 100 gramos, 1.5 g uretano/Kg de animal), vía intraperitoneal (Livingstone & Livingstone, 1970) para la eutanasia, según protocolo Nro 015/2015 aprobado por el CICUAL de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. Inmediatamente se aislaron rápidamente los órganos viscerales y se mantuvieron en solución Tyrode los duodenos e íleons y vejiga, con aireación. Los úteros aislados se mantuvieron en

solución de Jalon, también bajo burbujeo de aire.

4.4 Preparados biológicos

Los duodenos e íleons de cada rata se montaron en cuatro cubas de doble camisa termostatizadas a 37°C, conteniendo 20 ml de solución Tyrode y bajo burbujeo constante de aire (pH 8.2) (Livingston & Livingstone, 1970; Ragone y col. 2007; Consolini y col. 2011; Blanco y col. 2013). Fueron sujetos longitudinalmente manteniendo el tubo intestinal abierto para facilitar la circulación de solución y la oxigenación en su interior. Por otra parte, en la vejiga se cortaron tiras en el eje longitudinal de 2 mm de ancho y 5mm de longitud aproximadamente, cada una de las cuales se montó en una cuba termostatizada a 37°C. Tanto intestino como vejiga se sumergieron totalmente en la respectiva solución Tyrode, sujetos longitudinalmente mediante hilo de cirugía en el extremo inferior a un soporte fijo y el superior a un transductor de fuerza isométrico (WPI Instruments, USA) acoplado a un amplificador de 4 canales (TBM4M, Instruments, USA) para la adquisición en computadora mediante tarjeta A/D Eagle (USA).

Los cambios en la tensión fueron medidos por un transductor de fuerza isométrico MLT0210/A (Power Lab, AD Instruments) y un sistema de adquisición analógico-digital LabChart (AD Instruments, USA).

Cada útero fue dividido en sus dos ramas y respectivamente montados en dos cubas de doble camisa termostatizadas a 32°C conteniendo 20 ml de solución de Jalon y burbujeadas constantemente con aire (Kitchen, 1984). Fueron montadas longitudinalmente manteniendo el tubo abierto para facilitar la circulación de solución y la oxigenación en su interior. Se sumergieron en la solución sujetos mediante hilo de cirugía del extremo inferior a un soporte fijo y en el extremo superior a un transductor de fuerza isométrico MLT0210/A (Power Lab, AD Instruments) conectado al amplificador y registrador digital LabChart (AD Instruments, USA).

4.5 Evaluación de la actividad antiespasmódica

4.5.1 En la contracción de intestino

La actividad antiespasmódica se evaluó en estudios *ex vivo*. Se realizaron curvas concentración-respuesta (CCR) acumulativas con carbacol (Cbl) como agonista muscarínico en las porciones de duodeno e íleon aislados de rata y sumergidos en solución Tyrode a 37°C, burbujeados con aire. Se midió contractilidad mediante un transductor de fuerza como se describió en trabajos anteriores (Ragone y col., 2007; Consolini y col., 2011; Matera y col., 2012; Colares y col., 2013; Blanco y col., 2013). En cada preparado se efectuaron sucesivas CCR de Cbl: control y control-vehículo (en ausencia de ISO), seguidas de CCR en presencia de únicas y crecientes concentraciones de ISO (3, 10, 30 y 100 μM). Después de una transitoria relajación del tejido por DMSO, la CCR no resultó diferente de las dos CCR control. Todas las CCR se analizaron referidas al 100% del efecto máximo (E_{max}) obtenido en la CCR control en presencia de DMSO. Al finalizar cada CCR se efectuaron 3 lavados consecutivos con Tyrode y se esperó 10 minutos de estabilización. Con el mismo tipo de protocolo se evaluaron los efectos de los análogos estructurales Phg y TMB mediante CCR del agonista Cbl, y se compararon sus efectos y parámetros de la CCR respectiva con los de ISO.

Se registró el grado de tensión longitudinal del tubo intestinal (Shamsa y col. 1999; Nocerino y col., 2002) en los puntos medios del movimiento pendular. Las respuestas a agonistas y los efectos de las diferentes diluciones del ISO no difirieron significativamente entre ambas porciones de intestino (duodeno e íleon).

Para evaluar los mecanismos de acción de ISO, se efectuó también un protocolo de CCR de calcio en medio despolarizante de alta $[\text{K}^+]$ (40 mM). Se realizaron las sucesivas CCR de Ca^{2+} en ausencia y presencia de las mismas concentraciones de ISO empleadas en las CCR de Cbl (3, 10, 30 y 100 μM).

Las CCR de Ca^{2+} en medio de Tyrode-40 mM K^+ para intestino se realizó en los preparados estabilizados en medio de Tyrode con Ca^{2+} , luego se reemplazó el medio por Tyrode-0- Ca^{2+} y se efectuaron 2 CCR control (sin pretratamiento) agregando 0.6 ml KCl 10% para llevar la $[\text{K}^+]$ a 40 mM. Además en los experimentos, se realizó un tercer control (control-vehículo) con el previo agregado de 0.2 ml del vehículo empleado para disolver la droga, el DMSO, el cual después de una transitoria relajación del tejido, no resultó diferente a las CCR control. A continuación, en cada preparado se efectuaron las sucesivas CCR de Ca^{2+} con el previo agregado (5 a 10 min antes de agregar el K^+) de una concentración única de ISO (sucesivamente en orden creciente de las concentraciones del compuesto). Todas las CCR se analizaron referidas al 100% del efecto máximo (Emax) obtenido en la CCR control-vehículo. Al finalizar cada CCR se efectuaron 3 lavados consecutivos con Tyrode-0 Ca^{2+} y se esperó 10 minutos de estabilización.

4.5.2 En la contracción de vejiga

Un protocolo análogo al utilizado en intestino se efectuó en los preparados aislados de vejiga contenidos en una solución Tyrode modificada (Hamada y col., 1997). Se realizaron CCR de carbacol en ausencia y presencia de concentraciones únicas y crecientes de ISO, TMB y Phg, y de verapamilo como control positivo. Las contracciones provocadas por carbacol carecieron de movimiento pendular por lo cual se midió la contracción máxima obtenida a cada concentración, y se refirieron a la máxima de la CCR control. También se evaluaron en vejiga los efectos y mecanismos de ISO y TMB en CCR de Ca^{2+} en medio despolarizante de alta $[\text{K}^+]$ (40 mM), con un procedimiento análogo al utilizado para intestino. En estas CCR de Ca^{2+} no se evaluó Phg debido a que este compuesto no inhibió la contracción en la CCR de Cbl.

4.5.3 Mediante curvas de relajación en vejiga

En vejiga se realizaron dos tipos de curvas de relajación (CR) en presencia del vehículo

(control) y de concentraciones crecientes de ISO, a saber.

a) CR sobre la contractura inducida por carbacol (Cbl): se obtuvo una contractura por el agregado de 0.2 ml de Cbl 200 $\mu\text{g/ml}$ (2 $\mu\text{g/ml}$ Tyrode en cuba). Las CR se obtuvieron por el agregado de concentraciones crecientes y acumulativas de ISO, en el rango de 3 a 143 μM en la cuba. Para evaluar el efecto del vehículo, en cada preparado se realizó previamente un control de CR con 2 agregados consecutivos de 0.2 ml de DMSO diluido 1:3 en agua, seguido de otros 2 agregados de DMSO puro (CR control-vehículo). La relajación resultante a cada agregado de vehículo fue restada del efecto del respectivo agregado con ISO.

b) CR del tejido bajo estimulación de campo eléctrico (ECE): La ECE fue realizada en vejigas enteras con estabilización de 1 hora aproximadamente bajo la aplicación de los electrodos de campo con un voltaje de 50V y 10Hz. Las CR se obtuvieron por el agregado de concentraciones crecientes y acumulativas de ISO (de 3 a 143 μM de cuba), con espera de 5 minutos entre dos sucesivos agregados. Previamente, se realizó una CR control-vehículo con los mismos 4 sucesivos agregados de vehículo explicados en el punto anterior.

4.5.4 En la contracción uterina

Se evaluaron CCR acumulativas del agonista serotonina (5HT), en ausencia y presencia del vehículo (DMSO, como control negativo) y de únicas y crecientes concentraciones de ISO (3 a 100 μM). Se realizaron 2 CCR control (sin pretratamiento), un control-vehículo con el previo agregado de 0.2 ml del solvente empleado DMSO, y las sucesivas CCR de 5-HT con el previo agregado (5 a 10 min antes) de una concentración única de ISO (en orden creciente de concentración). Dado que el útero posee una actividad espontánea de espigas de gran amplitud, los efectos del agonista se midieron de 2 maneras: como valores máximos de dichas espigas, y como amplitud de las mismas. Si bien los efectos y CCR resultaron comparables, se eligió el primer método por generar respuestas menos dispersas. Todas las CCR se analizaron referidas al

100% del efecto máximo (Emax) obtenido en la CCR control-vehículo. Al finalizar cada CCR se efectuaron 3 lavados consecutivos con solución de Jalon y se esperó 10 minutos de estabilización.

4.5.5 Mediante curvas de relajación en útero

En útero, se realizaron las CR de ISO y adrenalina por separado, ambas sobre el tejido pre-contractado con 5-HT, midiendo siempre los picos máximos de las contracciones fásicas.

a) *CR de ISO* sobre la contractura obtenida por el agregado de 0.2 ml de 5-HT 200 µg/ml (2 µg/ml de solución de Jalon en la cuba). Las CR se obtuvieron por el agregado de concentraciones crecientes y acumulativas de ISO (3 a 143 µM de cuba), según se indica en las respectivas figuras en la sección Resultados. Previamente, se realizó una CR control-vehículo con los mismos 4 sucesivos agregados de vehículo explicados en el punto anterior.

b) *CR de adrenalina* en útero: en condición de actividad fásica del útero bajo contractura de 5-HT se agregó adrenalina gradualmente en concentraciones crecientes y acumulativas a razón de 0.2 ml de soluciones entre 1 y 1000 µg/ml (resultando 0.01 a 10 µg/ml de solución de Jalon en cuba). Se utilizó el procedimiento de CR descrito anteriormente sin efectuar control-vehículo porque la adrenalina es soluble en agua.

4.6 Soluciones empleadas y curvas concentración-respuesta

4.6.1 Intestino y vejiga

Solución Tyrode (concentraciones en mM): 8.0 NaCl, 2.0 KCl, 2,6 MgCl₂, 1.0 NaHCO₃, 1.3 PO₄H₂Na, 1.0 C₆H₁₂O₆, 1.8 CaCl₂ para intestino y 2.5 CaCl₂ para vejiga (Hamada y col., 1997). El burbujeo se efectuó con aire, la temperatura de 37°C, lo cual determina un pH de 8.2 que es considerado el óptimo para el intestino aislado (Livingston & Livingston, 1970; Hamada y col.,

1997).

Tyrode sin Calcio (0-Ca): misma composición que el Tyrode sin agregado de CaCl_2 .

Tyrode 0-Ca 40mM K: con agregado de 0.6 ml de solución de KCl 10% en cada cuba de 20 ml de Tyrode 0-Ca.

CCR de Carbacol: se agregaron sucesiva y acumulativamente 0.2 ml de carbacol a concentraciones 1, 2, 7, 20, 70 y 200 $\mu\text{g/ml}$ en 20 ml de Tyrode (dilución 1/100 en cuba).

4.6.2 Útero

Solución de Jalon (concentraciones en mM): 9.0 NaCl, 0.5 NaHCO_3 , 0.5 $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, 0.4 KCl, 0.1 CaCl_2 . El burbujeo se efectuó con aire, la temperatura se mantuvo a 32 °C.

CCR de serotonina: se agregaron sucesiva y acumulativamente 0.2 ml de serotonina (5-HT) a concentraciones 1, 2, 7, 20, 70 y 200 $\mu\text{g/ml}$ en 20 ml de solución de Jalon (dilución 1/100 en cuba).

4.7 Cálculo de parámetros

En las CCR de Cbl, de Ca^{2+} y 5HT se calcularon los $\text{pD}_2 = \text{pCE}_{50} = -\log\text{CE}_{50}$ (Molar) del agonista (donde CE_{50} es la concentración de agonista que produce el 50% del efecto máximo, E_{max}). Además se construyeron las curvas de inhibición de los compuestos ISO, Phg, TMB y Vpl graficando los efectos máximos del agonista obtenidos en las sucesivas CCR en ausencia y presencia del antagonista versus la concentración de dicho antagonista. A partir de estas curvas se extrapola la concentración inhibitoria 50% (CI_{50}) de cada compuesto, como aquella que reduce el efecto del agonista al 50% del E_{max} . Las curvas de inhibición calculadas se muestran en cada figura después de las respectivas CCR.

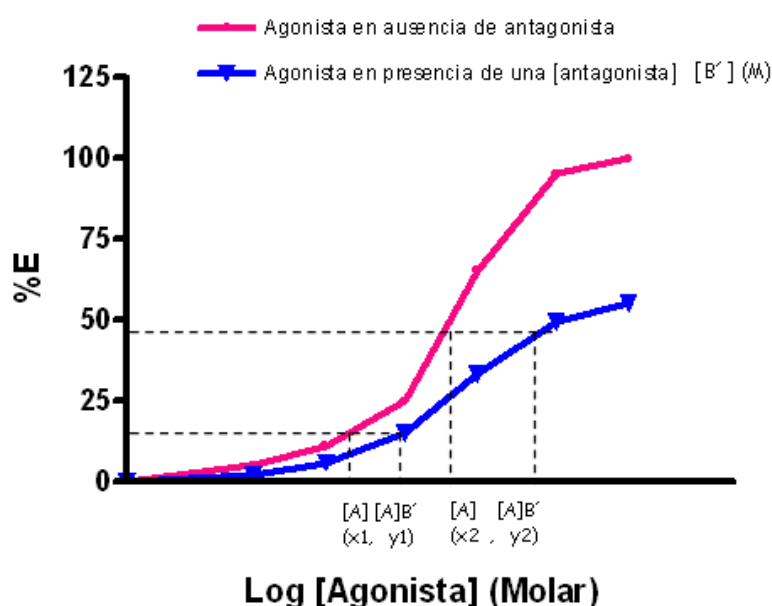
Puesto que se trabajó con compuestos puros (ISO, Phg, TMB y Vpl) que produjeron inhibición no competitiva de la CCR de los agonistas o de calcio, se pudo estimar la **constante de**

afinidad de cada compuesto por su respectivo sitio de unión, mediante el cálculo del $pD'_2 = pK_{B'}$
 $= -\log [B'] + \log [(E_A - E_{AB'_{max}})/(E_A - E_{AB'}) - 1]$ donde $[B']$ es la concentración del antagonista no-competitivo B' (en molar), y E_A , $E_{AB'}$ and $E_{AB'_{max}}$ son respectivamente los máximos efectos del agonista en ausencia (A) y presencia del antagonista (AB') y de su máxima concentración (AB'_{max}) (Van der Brink, 1977; Kenakin, 1984).

Además, siguiendo las últimas teorías sobre cálculos de la afinidad de antagonistas no-competitivos por su propio receptor, se contrastaron los valores calculados como pD'_2 con los obtenidos por el **método de Gaddum** (Kenakin, 2014). Este consiste en comparar concentraciones equiefectivas de carbacol en ausencia ($[A]$) y presencia del antagonista ($[A]_{B'}$), obteniendo varios pares ordenados (Figura 5). Luego se grafica como $1/[A]_{B'}$ en el eje de las ordenadas versus $1/[A]$ en las abscisas, se obtiene la ecuación de la recta, con su respectiva pendiente la cual se utiliza para el cálculo de la ecuación de Gaddum, con la siguiente fórmula:

$$K_{B'} = \frac{[B']}{(pendiente - 1)}$$

donde $[B']$ es la concentración del antagonista (en M), y se obtiene pK (afinidad por el receptor) al calcular el $-\log$ del $K_{B'}$. Se muestra a continuación un esquema gráfico para el cálculo.



$$K_{B'} = \frac{[B']}{(\text{pendiente} - 1)}$$

$$K_{B'} = \frac{[1 \times 10^{-5}]}{(1.7861 - 1)}$$

$$pK = -\log K_{B'}$$

$$pK = 4.84 \pm 0.15$$

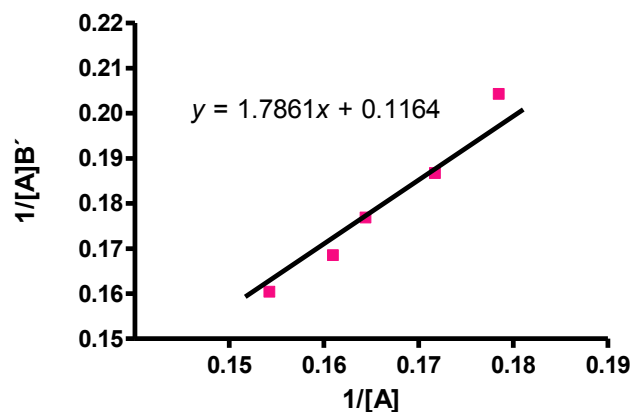


Figura 5: Cálculo de la afinidad del antagonista no-competitivo por el método de Gaddum: ejemplo de CCR a partir de la cual se obtienen los pares ordenados de concentraciones de agonista ($[A]$) en ausencia y presencia de antagonista ($[B']$) que se emplean para obtener la recta, a partir de la cual se obtiene el $K_{B'}$ (ver el método en el texto)

4.8 Actividad citotóxica

4.8.1 Cultivo de células

Se mantuvieron macrófagos murinos RAW 264.7 (ECACC, Salisbury, UK) en medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con suero fetal bovino al 10% Suero fetal bovino (FBS), penicilina 100 U/mL y estreptomicina 100 µg/mL a 37°C en una incubadora humidificada que contiene 5% de CO₂. Para todos los experimentos, las células se sometieron a no más de 20 pasajes (Rojano y col., 2007).

4.8.2 Ensayo de MTT (Mosmann T. 1983).

El efecto citotóxico de los productos puros sobre distintos tipos celulares se determina utilizando el ensayo de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide). Se basa en la conversión del MTT de color amarillo a formazán de color azul oscuro por la succinato deshidrogenasa mitocondrial. Por lo tanto, la cantidad de formazán se relaciona directamente con el número de células metabólicamente activas.

RAW 264,7 macrófagos se sembraron en placas de 96 pocillos a 6×10^4 células/pocillo. Después de 24 h a 37 °C, se retiró el medio y se añadió DMEM suplementado con FBS al 0,5%, penicilina 100 U/mL y 100 µg/mL de estreptomicina. Los compuestos se añadieron al medio (1, 10 y 100 µM) y las células se incubaron durante 24h. Los controles se trataron con el vehículo (0,5% de DMSO) y corresponden al 100% de viabilidad. A continuación, se removió el medio de cultivo y se agregó una solución de MTT (0.5 mg/mL) disuelta en DMEM, en esas condiciones las células se incubaron durante 30 min a 37°C. Luego, se removió el medio de cultivo y los cristales de formazan se disolvieron en DMSO. El producto soluble se cuantificó, midiendo a 570 nm (con sustracción de fondo a 630 nm) en un lector de microplacas (Labsystems Multiskan®).

La viabilidad celular se determinó según la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{A_p}{A_c} \times 100$$

Donde A_p es la media aritmética de la absorbancia de la muestra problema y A_c es la media aritmética de la absorbancia del control

4.8.3 Tratamiento de las células para el estudio por citometría de flujo

RAW 264.7 macrófagos se sembraron en placas de 24 pocillos a 5×10^5 células/pocillo. Después de 24 h a 37 °C, se retiró el medio y se añadió DMEM suplementado con FBS al 0.5%, penicilina 100 U/mL y 100 µg/mL de estreptomicina. Los compuestos se añadieron al medio (1, 10 µM) y las células se incubaron durante 24 h. Los controles se trataron con el vehículo (0.5% de

DMSO).

4.8.4 Ensayo de exclusión de yoduro de propidio

Finalizado el periodo de incubación en presencia de los compuestos, las células se retiraron del recipiente de cultivo usando un raspador de células. Las células se lavaron con PBS [Solución búfer fosfato salino (g/l): NaCl 8.00, Na₂HPO₄ 1.16, KH₂PO₄, KCl 0.20, ajustar a pH 7.4] y se resuspendieron hasta una relación final de 1×10^6 células/mL en PBS conteniendo yoduro de propidio (20 µg/mL), se incubó durante 30 min en oscuridad a temperatura ambiente (Schinella y col., 2008).

La fluorescencia celular se detectó con la ayuda de un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson). Se registró un mínimo de 20.000 eventos por muestra. Las células con disminución de la integridad de la membrana mostraron mayor fluorescencia debido a una afluencia de yoduro de propidio y su consecuente unión al ADN y ARN. Las células que mostraron alta permeabilidad al yoduro de propidio se expresaron como un porcentaje de yoduro de propidio⁺.

4.8.5 Análisis de núcleos hipodiploides

La evaluación de núcleos hipodiploides se realizó por tinción con yoduro de propidio mediante una versión ligeramente modificada del método descrito por Nicoletti y col., 1991. Las células incubadas en presencia de los compuestos se suspendieron (1.0×10^6 /mL) en etanol al 70% enfriado con hielo y se almacenaron a -20°C durante al menos 12 horas, después de lo cual se lavaron dos veces en PBS a 4°C y se resuspendieron en 500 µL de solución de tinción de ADN (20 µg/mL de yoduro de propidio más 0.2 mg/mL de RNase A en PBS). Las células resuspendidas se incubaron entonces en la oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos y la fluorescencia de los núcleos individuales se midió con la ayuda de un citómetro de flujo FACScan. Se contó un mínimo de 20.000 eventos por muestra y se calculó el porcentaje de

núcleos de células apoptóticas (AP: pico de ADN hipodiploide).

4.8.6 Análisis de la externalización de fosfatidilserina

La exposición de fosfatidilserina (FS) se midió mediante unión a anexina V-FITC (Homburg y col., 1995). Durante las etapas iniciales de la apoptosis se observan alteraciones de la membrana plasmática. Una de estas alteraciones es la translocación de FS que normalmente se encuentra en la parte interna de la membrana plasmática a la superficie externa de la célula. La unión de la anexina V dependiente de calcio a los fosfolípidos, tiene una gran afinidad por la FS. Entonces, la anexina V es utilizada como una sonda sensible para la FS que se expone. Sin embargo, debido a la pérdida de integridad de la membrana en las células necróticas, la anexina V puede entrar en las células y se unen a la FS expuesta en la cara interna de la membrana celular. Por lo que, al mismo tiempo se tiñe con yoduro de propidio (PI) que se une a ADN cuando la membrana plasmática pierde integridad. Una célula en apoptosis se tiñe positiva con anexina V y cuando es negativa con yoduro de propidio y una célula necrótica se tiñe positivamente para la anexina V y PI, tanto porque la membrana de la célula no está intacta (Figura 6).

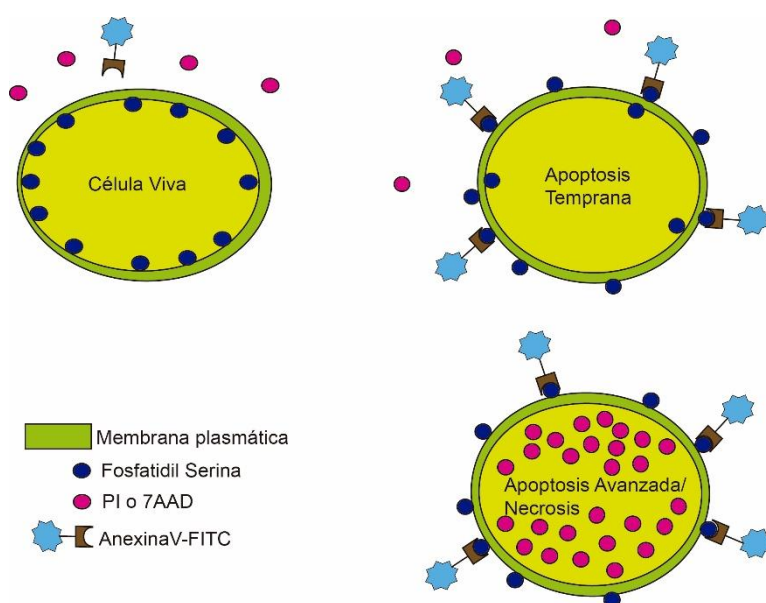


Figura 6. *Esquema general de la externalización de fosfatidilserina donde se muestra cuando una célula viva es impermeable a Anexina y yoduro de propidio, una célula apoptótica con translocación de su membrana, y una célula necrótica donde el yoduro de propicio ingresa a la célula.*

Después de las incubaciones apropiadas con los compuestos, las células se lavaron dos veces con PBS frío y luego se resuspendieron en solución tampón de unión (Hepes/NaOH 10 mM pH 7.4; NaCl 140 mM; CaCl₂ 2,5 mM) a una concentración de 1×10^6 células/mL. A continuación, se transfirieron 1×10^5 células a un tubo de cultivo de 5 ml donde se añadieron 5 µL de Anexina V - FITC y 10 µL de solución yoduro de propidio (50 µg/mL en PBS). Los tubos se incubaron entonces durante 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Después de la incubación, se añadieron 400 µL de tampón de unión a cada tubo y se analizaron por citometría de flujo.

4.9 Estadística de los resultados

Los resultados fueron expresados como media \pm ESM (n es número de experimentos) y las CCR consecutivas de un mismo protocolo se compararon por ANOVA de dos vías, considerando las variables $-\log$ [agonista] y tratamiento (concentración del antagonista, [B']). En cada análisis se aplicaron los varios tests a posteriori de Bonferroni para las comparaciones pareadas de los efectos de cada concentración de agonista en presencia de las varias [B'] versus la curva control. En otras comparaciones de una sola variable entre varios tratamientos se utilizó ANOVA. Se consideró un nivel de significancia de $p < 0.05$. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa Prisma 4.0.

5. RESULTADOS

5.1 Estudios de actividad antiespasmódica

5.1.1. Efectos antiespasmódicos en intestino

5.1.1.1 De Isoespintanol

El ISO inhibió en forma no-competitiva la CCR de carbacol (Cbl) en todas las concentraciones en un rango de 3 a 100 μM (Figura 7). La CCR de Cbl desarrolló un $\text{pCE}_{50} = 5.84 \pm 0.06$ ($n=8$), y la constante de afinidad de ISO fue calculada como $\text{pD}'_2 = \text{pK}_{\text{ISO}} = 4.78 \pm 0.09$. La concentración inhibitoria al 50% (CI_{50}) de ISO resultó de $12.5 \pm 4.2 \mu\text{M}$.

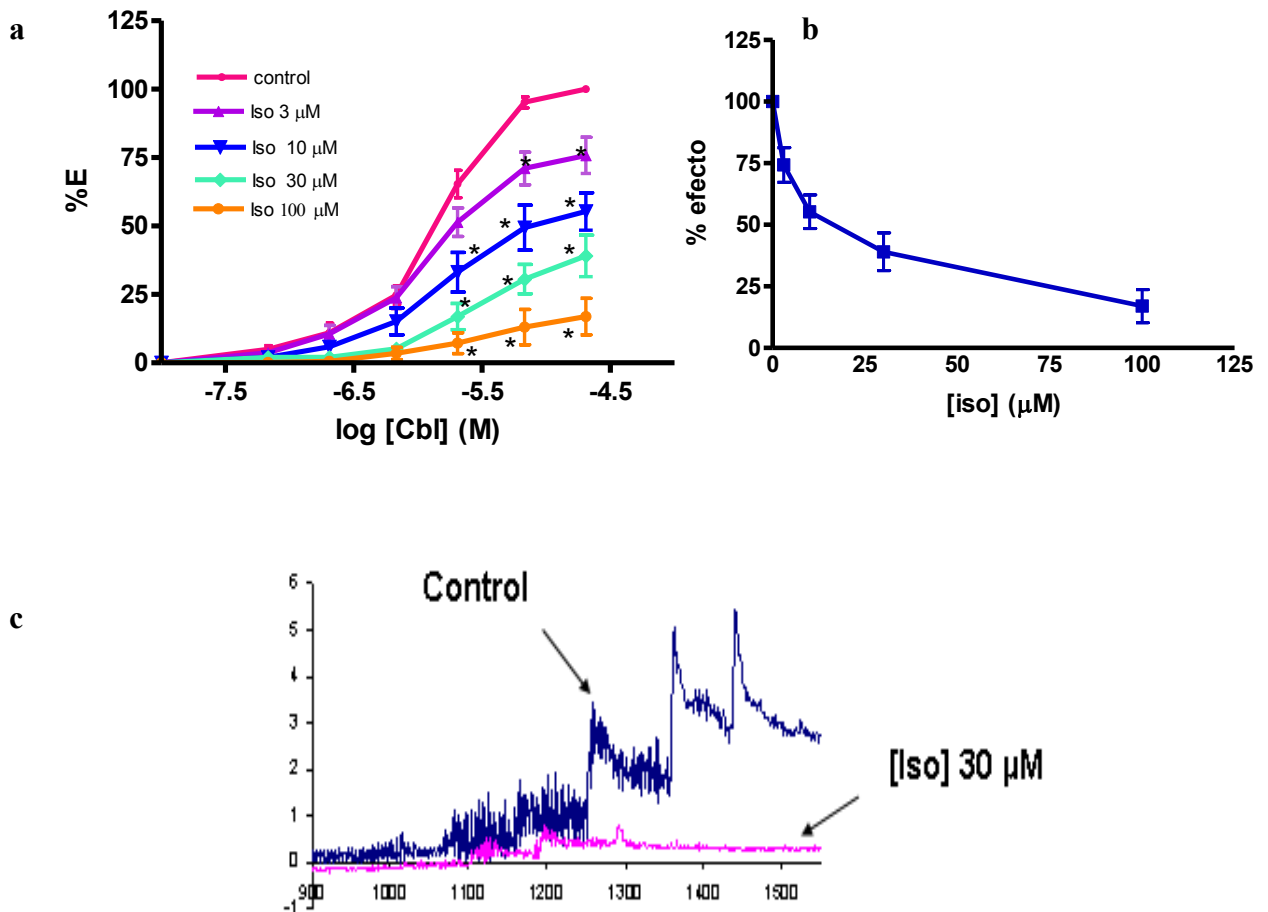


Figura 7: a) Curva concentración-respuesta contráctil de carbacol (Cbl) en intestino en ausencia y presencia de concentraciones únicas y crecientes de isoespintanol (indicadas en la leyenda); b) Curva de inhibición para el cálculo de CI_{50} de ISO (valores expresados como media \pm ESM). En (a) ANOVA de 2 vías: por tratamiento: $F = 90.40$, $p < 0.0001$, por $\log[\text{Cbl}]$: $F = 167$, $p < 0.0001$, post-tests: $*p < 0.05$ vs control, (c) registro que muestra la inhibición del efecto de la CCR-Cbl en presencia de ISO 30 μM (trazado rosa) comparado con la CCR control (en su ausencia, trazado azul).

Como método alternativo para el cálculo de la constante de afinidad de ISO frente a Cbl en intestino se empleó el método de Gaddum (ver punto 4.7 de Materiales y Métodos y Figura 5). A partir de ese método se obtuvo un $pK_{ISO} = 4.84 \pm 0.15$. La Tabla 1 muestra la correspondencia entre ambos métodos para el cálculo de la constante de afinidad de los antagonistas no-competitivos en los diversos protocolos.

Tabla 1. Comparación de las constantes de afinidad de los antagonistas no-competitivos isoespintanol (ISO) y verapamilo en los protocolos ensayados frente a las CCR de diversos agonistas.

Tejido	Antagonista	[Antagonista] (μ M)	Agonista	pK por Gaddum	pD'2 promedio
Intestino	ISO	10	Cbl	$4,84 \pm 0,15$ (n=4)	$4,78 \pm 0,09$ (n=29)
		10	Ca^{+2}	$4,65 \pm 0,15$ (n=5)	$5,10 \pm 0,10$ (n=36)
	Verapamilo	0,1	Cbl	$6,17 \pm 0,16$ (n=4)	$6,22 \pm 0,15$ (n=19)
		0,1	Ca^{+2}	$6,64 \pm 0,28$ (n=4)	$6,50 \pm 0,11$ (n=10)
	ISO	30	Cbl	$4,54 \pm 0,04$ (n=4)	$4,60 \pm 0,09$ (n=20)
		100	Ca^{+2}	$4,23 \pm 0,06$ (n=4)	$4,32 \pm 0,07$ (n=29)
Vejiga	Verapamilo	1	Cbl	$6,06 \pm 0,05$ (n=4)	$5,80 \pm 0,13$ (n=9)
Útero	ISO	10	5-HT	$5,40 \pm 0,20$ (n=5)	$5,05 \pm 0,06$ (n=5)

Las constantes de afinidad se obtuvieron a partir del método de Gaddum (aplicado a las CCR individuales de una concentración de antagonista que se indica en cada caso) y del cálculo tradicional de pD'2 (aplicado a todas las CCR individuales obtenidas a las varias concentraciones de antagonista de cada protocolo) (ver descripción de los métodos en el punto 4.7 de Materiales y Métodos de esta Tesis).

5.1.1.2 De trimetoxibenceno

El trimetoxibenceno (TMB) inhibió en forma no-competitiva la CCR de carbacol en intestino en el rango de concentraciones de 1 a 300 μ M (Figura 8). En esta serie, la CCR de Cbl desarrolló un $pCE_{50} = 6.07 \pm 0.03$ (n=5) y la constante de afinidad de TMB resultó $pD'2 = pK_{TMB} = 4.39 \pm 0.09$. La concentración inhibitoria al 50% (CI50) de TMB resultó de $152 \pm 33 \mu$ M.

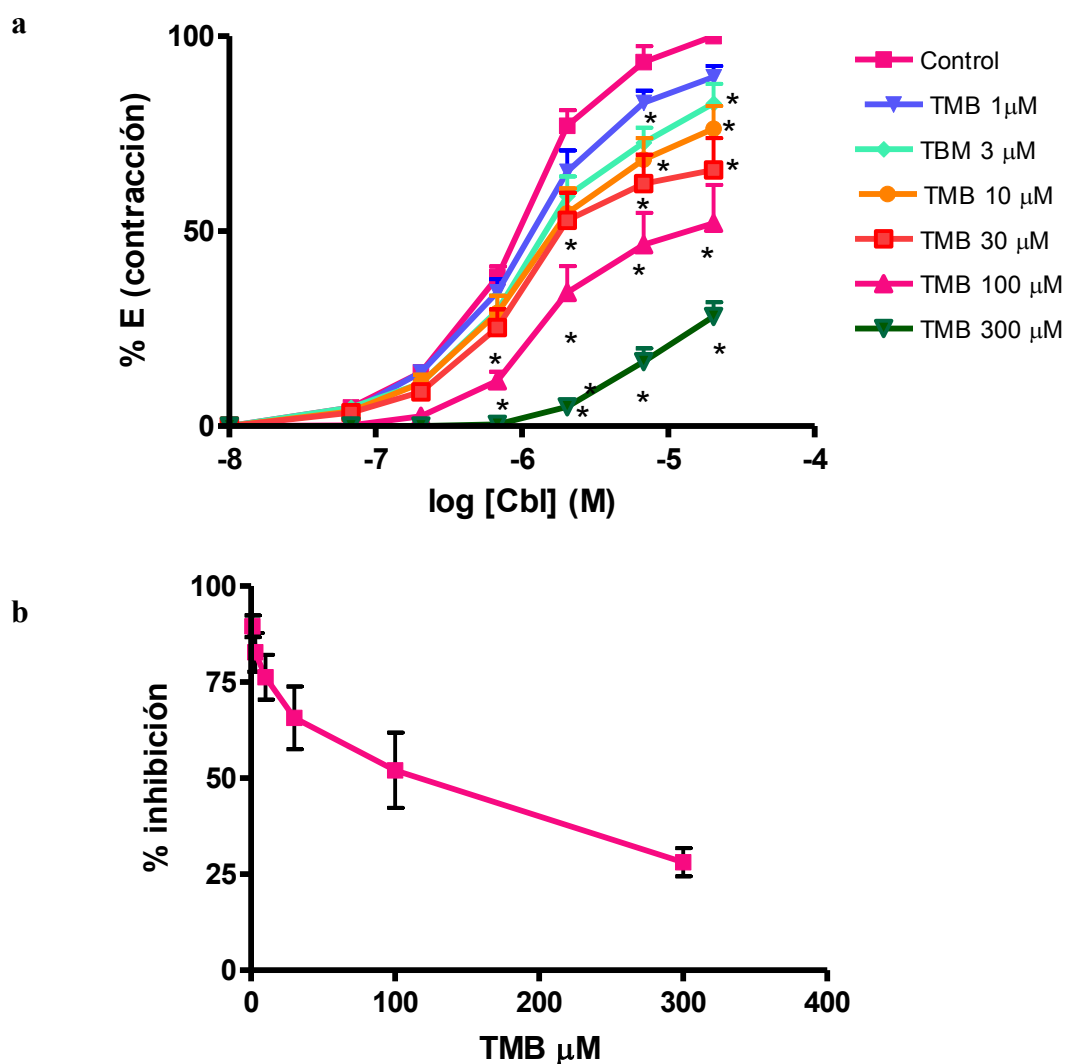


Figura 8: a) Curva concentración-respuesta contráctil de carbacol (Cbl) en intestino ausencia y presencia de concentraciones únicas y crecientes de TMB (indicadas en la leyenda); b) Curva de inhibición para el cálculo de CI50 de TMB indicado en el texto (valores expresados como media \pm ESM). En (a) ANOVA de 2 vías: por tratamiento: $F = 81.28$, $p < 0.0001$, por $\log [\text{TMB}]$: $F = 397.3$, $p < 0.0001$, post-tests: $*p < 0.05$ vs control)

5.1.1.3 De Floroglucinol

El floroglucinol (Phg) inhibió en forma no-competitiva incompleta a la CCR de Cbl en intestino en el rango de concentraciones de 1 a 200 μM (Figura 9). La CCR de Cbl desarrolló un $\text{pCE}_{50} = 6.36 \pm 0.08$ ($n=4$) y la constante de afinidad de Phg resultó $\text{pD}'_2 = \text{pK}_{\text{Phg}} = 4.77 \pm 0.12$. La concentración inhibitoria al 50% (CI50) de Phg resultó de $7.1 \pm 1.31 \mu\text{M}$.

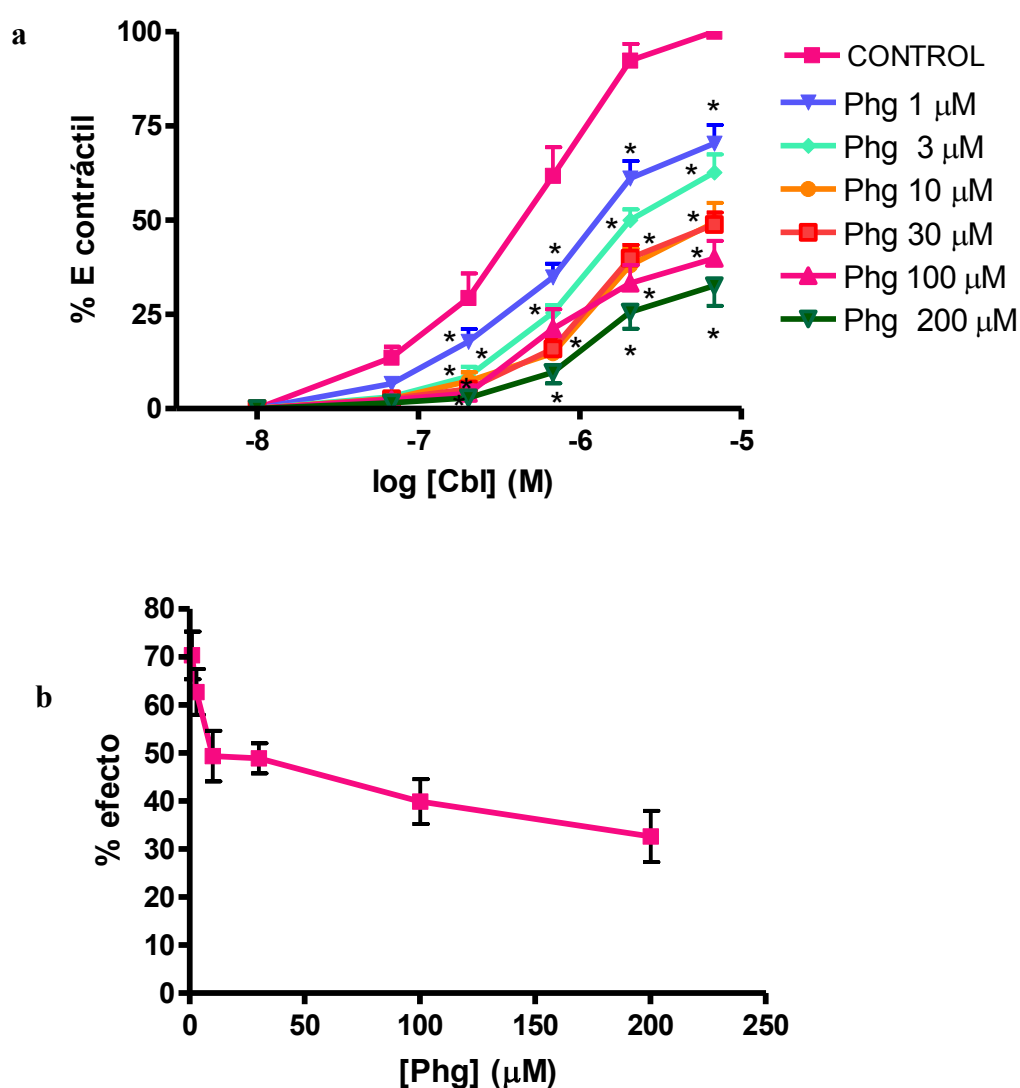


Figura 9: a) Curva concentración-respuesta de Carbacol (Cbl) en intestino en ausencia y presencia de concentraciones únicas y crecientes de Phg (indicadas en la leyenda); b) Curva de inhibición para el cálculo de CI50 de Phg indicado en el texto (valores expresados como media \pm ESM). En (a) ANOVA 2 vías: por tratamiento: $F= 82.68$, $p<0.0001$, por log [Phg]: $F: 339.5$, $p<0.0001$, post-tests: $*p<0.05$ vs control.

5.1.1.4 Comparación de las potencias de los antagonistas en intestino

Comparando en un mismo gráfico las curvas de inhibición de la contracción de carbacol, e incluyendo datos previos de las CCR en presencia del antagonista cálcico verapamil obtenidas previamente en nuestro laboratorio (Blanco y col. 2013) surge que ISO tiene una potencia inhibidora de la contracción que es menor que la de verapamil, igual a la de Phg y mayor que la

de TMB (Figura 10).

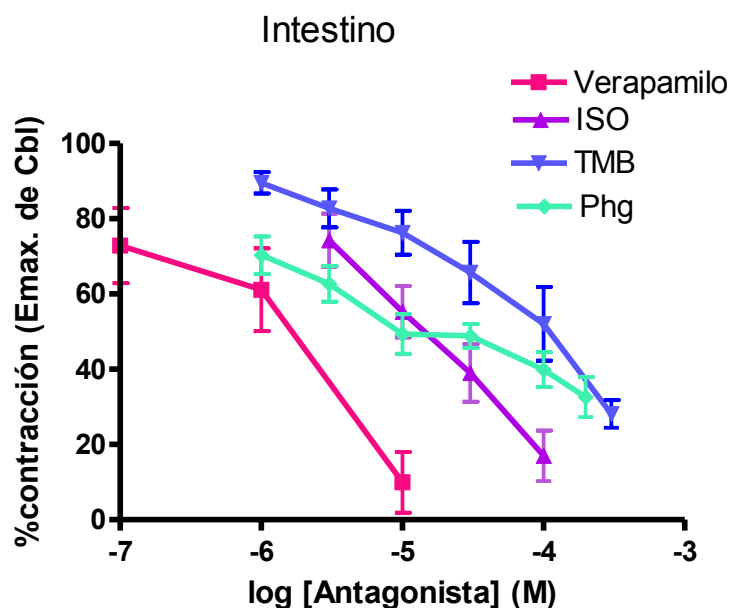


Figura 10: Comparación de las curvas de inhibición de las CCR de carbacol en intestino de rata producidas por Isoesipintanol (ISO), TMB, Phg y verapamilo, como inhibidores no-competitivos. Las concentraciones se expresaron en las mismas unidades (mol/L). Si se comparan los puntos de CI50 puede verse que el ISO fue 8 veces más potente que TMB y similarmente potente que Phg, pero 9 veces menos potente que el verapamilo.

5.1.2 Efectos antiespasmódicos en vejiga

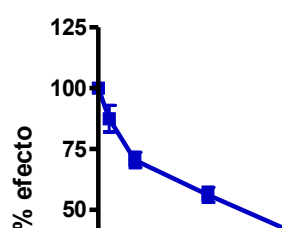
5.1.2.1 De Isoesipintanol en la CCR de carbacol

El ISO inhibió en forma no-competitiva la CCR de Cbl en vejiga, en el rango de concentraciones de 3 a 100 μ M (Figura 11). La CCR de Cbl desarrolló un $pCE_{50} = 5.70 \pm 0.11$ (n=5) y la constante de afinidad de ISO resultó de $pD'2 = pK_{ISO} = 4.60 \pm 0.09$. La concentración inhibitoria al 50% (CI50) de ISO resultó de $38.64 \pm 3.1 \mu$ M. Por el método de Gaddum se obtuvo un $pK_{ISO} = 4.54 \pm 0.04$ en la CCR con la concentración 30 μ M de ISO, como se muestra en resumen en la Tabla 1.

a



b



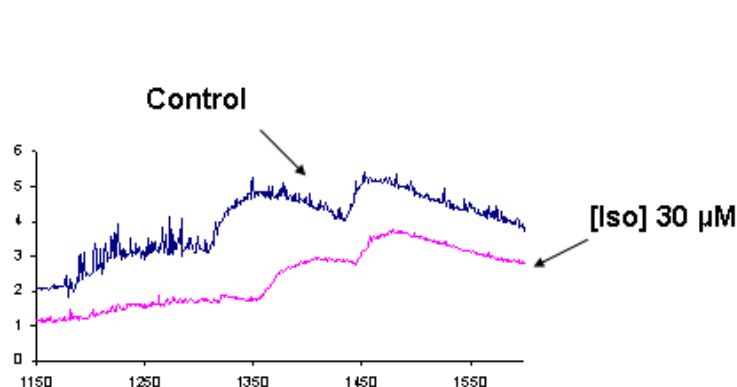
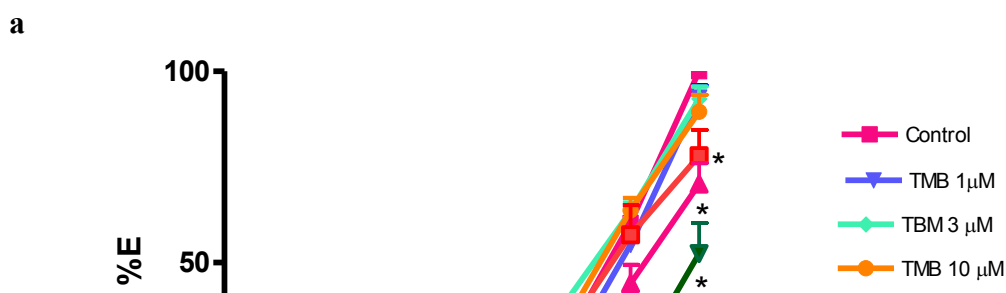


Figura 11: a) Curva concentración-respuesta de Carbacol (Cbl) en vejiga, en ausencia y presencia de concentraciones únicas y crecientes de ISO (indicadas en la leyenda); b) Curva de inhibición para el cálculo de CI50 de ISO indicado en el texto (valores expresados como media \pm ESM). En (a) ANOVA de 2 vías: por tratamiento: $F = 95.39$, $p < 0.0001$, por $\log [Cbl]$: $F = 271.5$, $p < 0.0001$, post-tests: $*p < 0.05$ vs control, (c) registro típico que muestra la inhibición a la CCR-Cbl en presencia de ISO 30 μ M comparado con el control (ausencia).

5.1.2.2 De trimetoxibenceno en la CCR de carbacol

El TMB inhibió poco a la CCR de Cbl en vejiga, recién en las concentraciones de 30 a 300 μ M y en forma no-competitiva (Figura 12). La CCR de Cbl desarrolló un $pCE_{50} = 5.43 \pm 0.06$ y la afinidad de TMB resultó $pD'2 = pK_{TMB} = 4.01 \pm 0.12$. La concentración inhibitoria al 50% (CI50) no se pudo calcular porque el TMB no alcanzó a inhibir hasta el 50% en todas las preparaciones ensayadas. En cambio se calculó una concentración inhibitoria al 40% (CI40 de $231 \pm 36 \mu$ M)



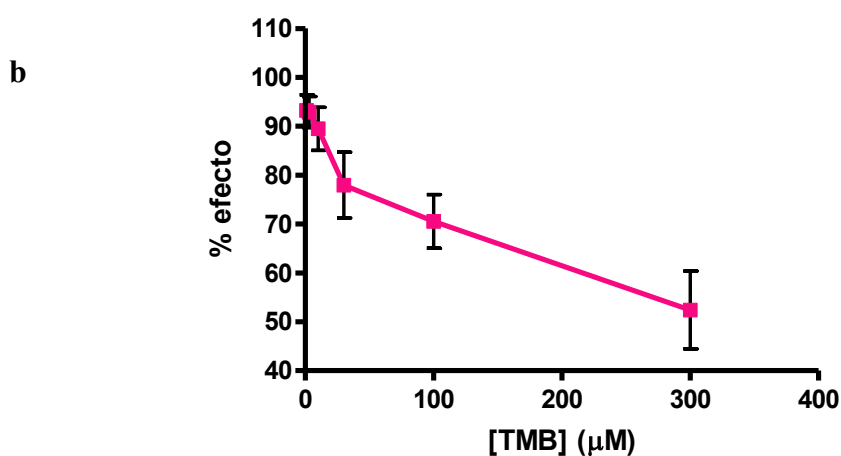


Figura 12: a) Curva concentración-respuesta de carbacol (Cbl) en vejiga, en ausencia y presencia de concentraciones únicas y crecientes de TMB (indicadas en la leyenda); b) Curva de inhibición para el cálculo de CI_{50} de TMB indicado en el texto (n : número de experimentos, valores expresados como media \pm ESM). En (a) ANOVA de 2 vías: por tratamiento: $F= 28.01$, $p<0.0001$, por $\log [Cbl]$: $F= 964.7$, $p<0.0001$, post-tests: $*p<0.05$ vs control.

5.1.2.3 De floroglucinol en la CCR de carbacol

El Phg no inhibió a la CCR de carbacol en vejiga, en ninguna de las concentraciones ensayadas (en las cuales Phg era inhibidor en intestino) (Figura 13).

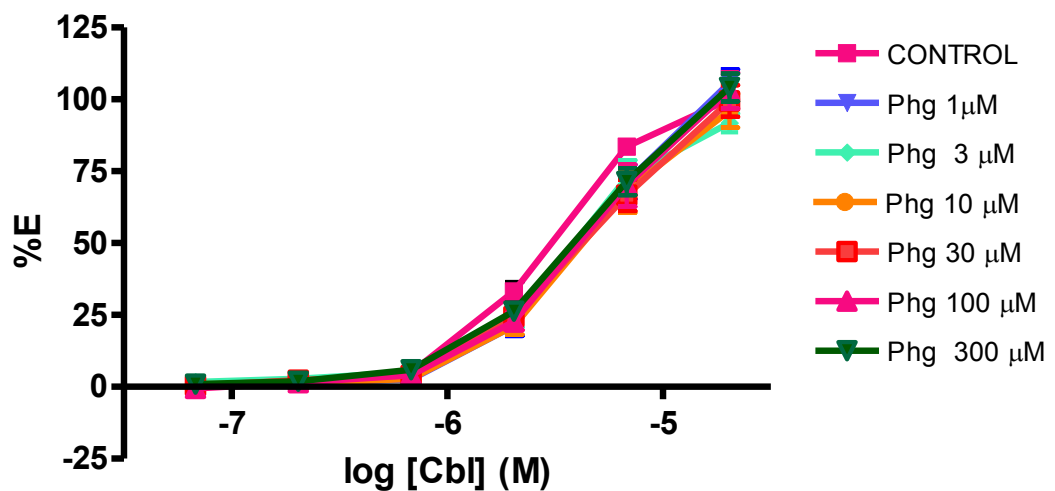
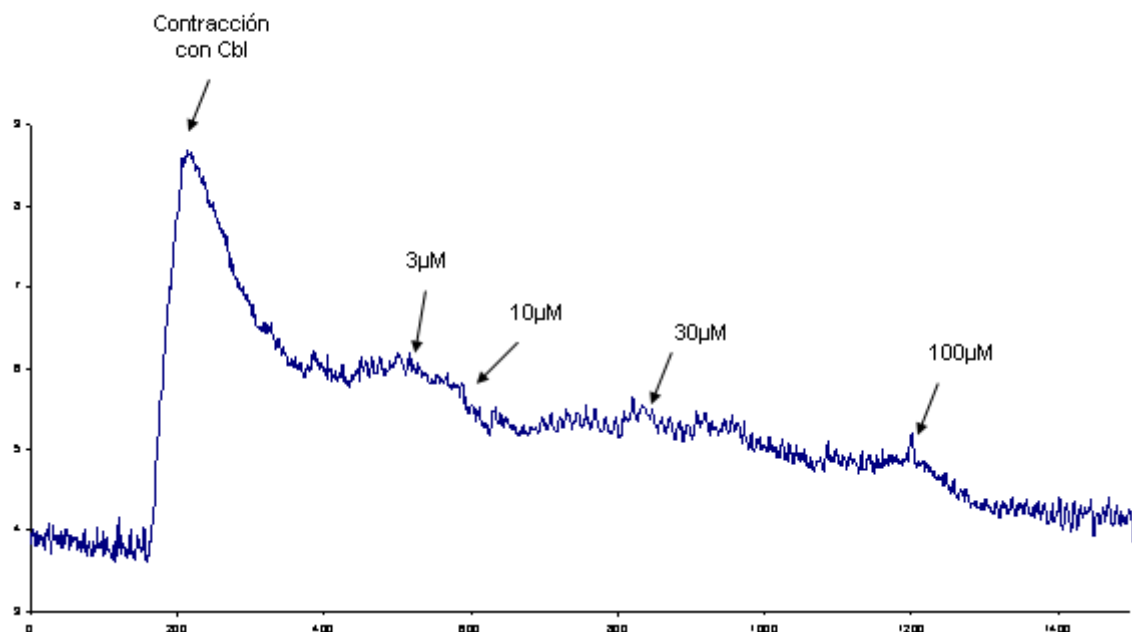


Figura 13: Curva concentración-respuesta contráctil de carbacol en vejiga y en ausencia y presencia de varias concentraciones de Phg entre 1 y 300 μM . ANOVA de 2 vías: por tratamiento: $F= 1.6$, $p=0.147$ NS, por $\log [\text{Cbl}]$: $F: 1138$, $p<0.0001$ ($n= 6$ experimentos).

5.1.2.4 Efectos relajantes sobre la contractura de carbacol en vejiga

Para caracterizar mejor el efecto relajante de isoespintanol en vejiga, se aplicó una curva acumulativa de ISO sobre la contractura tónica producida por Cbl. Una vez que se descontó el efecto relajante del vehículo DMSO (Figura 14a) el isoespintanol relajó de modo concentración dependiente hasta en un $66 \pm 2 \%$ ($n= 4$) de la contracción tónica inducida por Cbl 0.7 $\mu\text{g/ml}$. A partir de la CCR de relajación se interpoló la concentración que produjo el 50% del efecto relajante (a la cual se inhibió un 33% de la contracción tónica inicial), la cual resultó de 11.5 ± 0.5 μM .



a

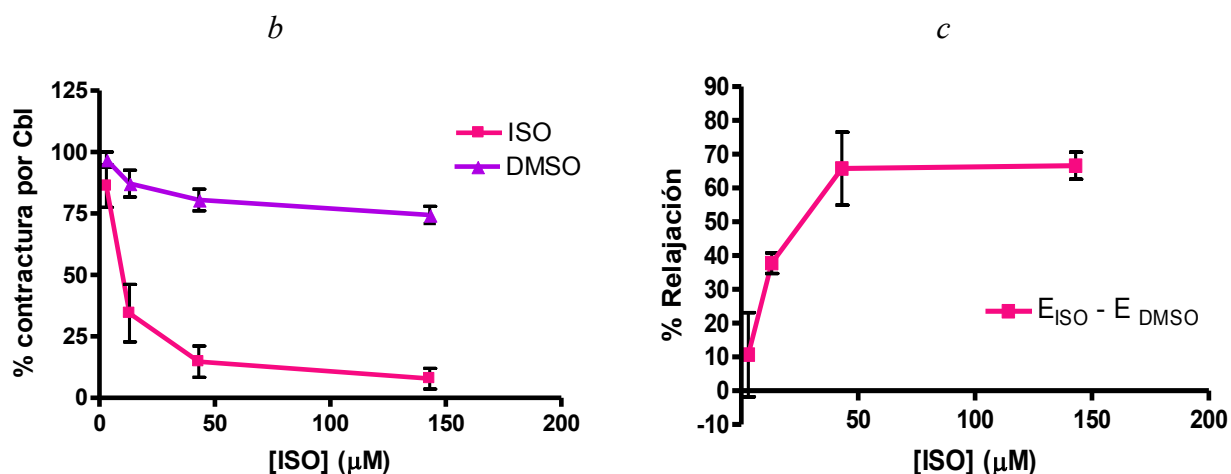


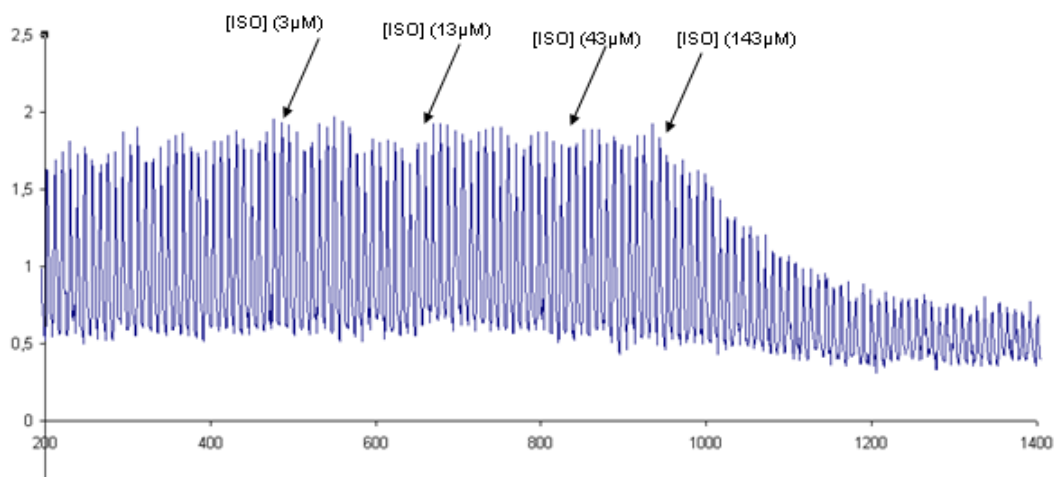
Figura 14: Efectos de isoespintanol ($n = 6$) en la contractura tónica máxima producida por Cbl 0.7 µg/ml en vejiga: a) registro típico, b) Curvas de relajación de la contractura tónica de ISO y vehículo, c) relajación producida por el ISO solo (habiendo descontado el efecto del DMSO).

5.1.2.5 Efectos de ISO sobre la vejiga bajo estimulación de campo eléctrico

Se evaluaron los efectos del isoespintanol sobre la actividad contráctil fásica provocada por estimulación eléctrica de campo en la vejiga. El ISO redujo de modo concentración dependiente en promedios de 5, 21, 28 y 44% a la amplitud de las contracciones fásicas, mientras el DMSO no las inhibió significativamente. La Figura 15 muestra un registro típico y la curva de inhibición de las contracciones fásicas por estímulo eléctrico, de la cual se interpola la concentración de ISO

para dar el 50% de su efecto inhibitor, CI50 de $35.1 \pm 20 \mu\text{M}$, obtenida al 71% de la contracción fásica inicial.

a



b

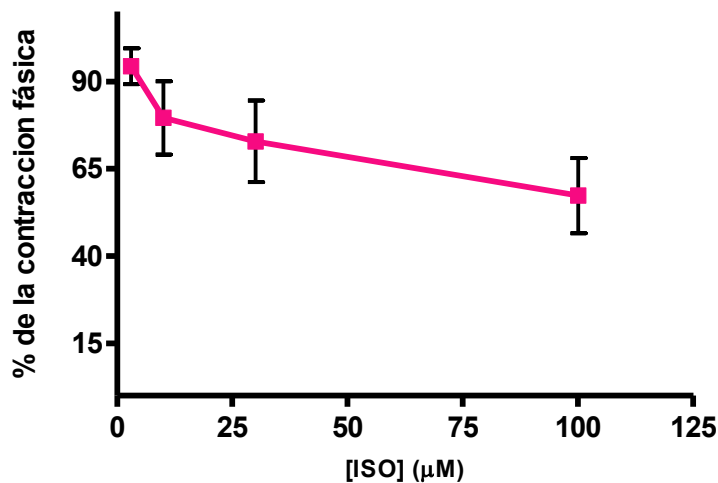


Figura 15: a) Registro típico de los efectos de isoespintanol en vejiga bajo estimulación eléctrica de campo, y b) Curva de inhibición de ISO ($n= 4$) de las contracciones fásicas producidas por la estimulación eléctrica de campo

5.1.2.6 Efectos antiespasmódicos de verapamilo en vejiga

Considerando que al ser un antagonista no-competitivo el isoespintanol podría actuar

inhibiendo el influjo de Ca^{2+} al músculo liso de vejiga, evaluamos los efectos del bloqueante de los canales de Ca^{2+} verapamilo (Vpl) como un control positivo. El verapamilo también inhibió en forma no-competitiva a la CCR de carbacol de modo dependiente de la concentración en el rango de 0.1 a 10 μM (Figura 16). En la CCR Cbl desarrolló una $\text{pCE}_{50} = 5.83 \pm 0.04$ ($n=4$) y la concentración inhibitoria de verapamilo resultó de $0.83 \pm 0.05 \mu\text{M}$ (Figura 16). La constante de afinidad de verapamilo fue calculada como $\text{pD}'_2 = \text{pK}_{\text{ver}} = 5.80 \pm 0.13$, y por el método de Gaddum se obtuvo un $\text{pK}_{\text{ver}} = 6.06 \pm 0.05$ (Tabla 1).

a

b

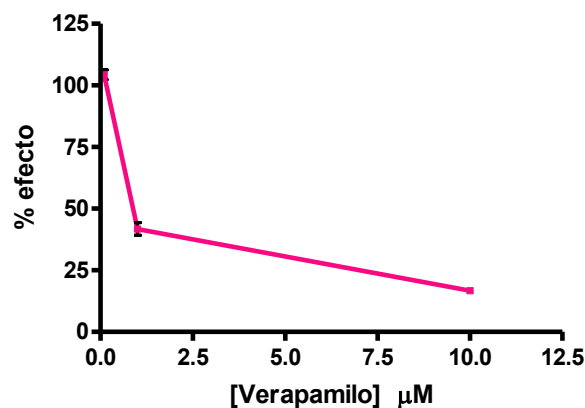


Figura 16: Curva concentración-respuesta de carbacol (Cbl) en ausencia y presencia de tres concentraciones de verapamilo (a) y cálculo de la CI_{50} de $0.83 \pm 0.05 \mu\text{M}$ ($n=4$) (b). En (a): ANOVA de 2 vías: por tratamiento: $F = 589$, $p < 0.0001$, por $[\log \text{Cbl}]$: $F = 896.7$, $p < 0.0001$, post-tests: $*p < 0.05$ vs control

5.1.2.7 Comparación de las potencias de los antagonistas en vejiga

Comparando en un mismo gráfico las curvas de inhibición de Isoesipintanol, TMB y verapamilo sobre la contracción de carbacol en vejiga surge que ISO tiene una potencia

inhibidora de la contracción que es menor que la de verapamilo, y mayor que la de TMB (Figura 17).

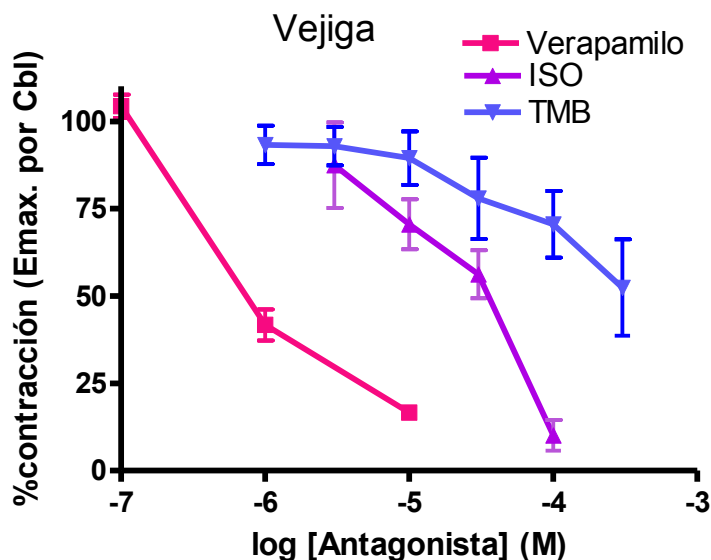


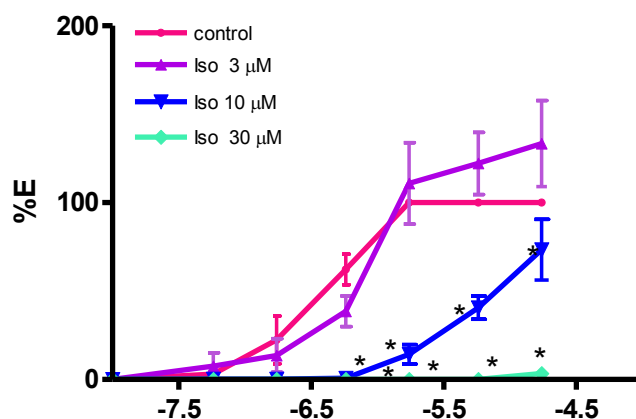
Figura 17: Comparación de las curvas de inhibición del isoespintanol, TMB y del verapamilo en vejiga, obtenidas a partir de las CCR de carbacol bajo inhibición no-competitiva, y expresadas en las mismas unidades (mol/L). Comparando las CI₄₀ puede verse que el ISO resultó 8 veces más potente que TMB, pero 40 veces menos potente que el verapamilo.

5.1.3 Efectos antiespasmódicos en útero

5.1.3.1 De Isoespintanol

El Iso inhibió en forma no-competitiva la CCR de 5-HT en el rango de concentraciones de 3 a 30 μ M (Figura 18). La CCR de 5-HT desarrolló un pCE₅₀ = 6.71 ± 0.07 (n=6) y la concentración inhibitoria al 50% (CI₅₀) de ISO resultó de 13.7 ± 2.7 μ M. La constante de afinidad de ISO resultó pD'₂ = pK_{ISO} = 5.05 ± 0.06 y por el método de Gaddum se obtuvo un pK_{ISO} = 5.4 ± 0.2 (Tabla 1).

a



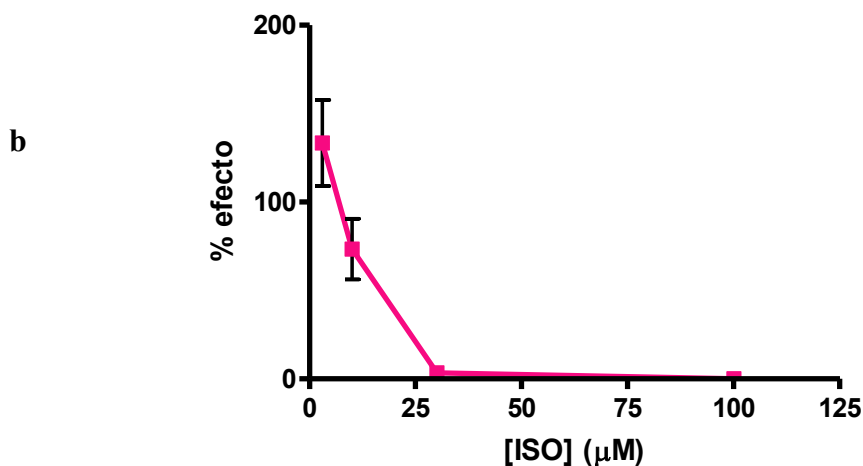


Figura 18: a) Curva concentración-respuesta de serotonina (5-HT) en ausencia y presencia de concentraciones únicas y crecientes de isoespintanol (indicadas en la leyenda) en útero; b) Curva de inhibición para el cálculo de CI_{50} de Iso (n : número de experimentos, valores expresados como media \pm ESM). En (a): ANOVA de 2 vías: por tratamiento: $F= 92.40$, $p<0.0001$, por log [ISO]: $F= 50.71$, $p<0.0001$, post-tests: $*p<0.05$ vs control.

5.1.3.2 Efectos de Isoespintanol sobre la contractura inducida por 5-HT en útero

El Isoespintanol relajó la contractura provocada por 5-HT, aún después de descontar la relajación producida por el vehículo DMSO (Figuras 19 y 20a). La máxima relajación se obtuvo a la concentración de ISO 13 μ M y alcanzó un 45% de la contractura tónica de 5-HT (medida como los máximos de las espigas en la etapa tónica) (Figura 20b). A partir de esa curva se obtuvo la concentración relajante al 50% del E_{max} , $CE_{50}= 7.1 \pm 1.16$ por interpolación al 22.5% de la contractura tónica de 5-HT (Figura 20b).

a

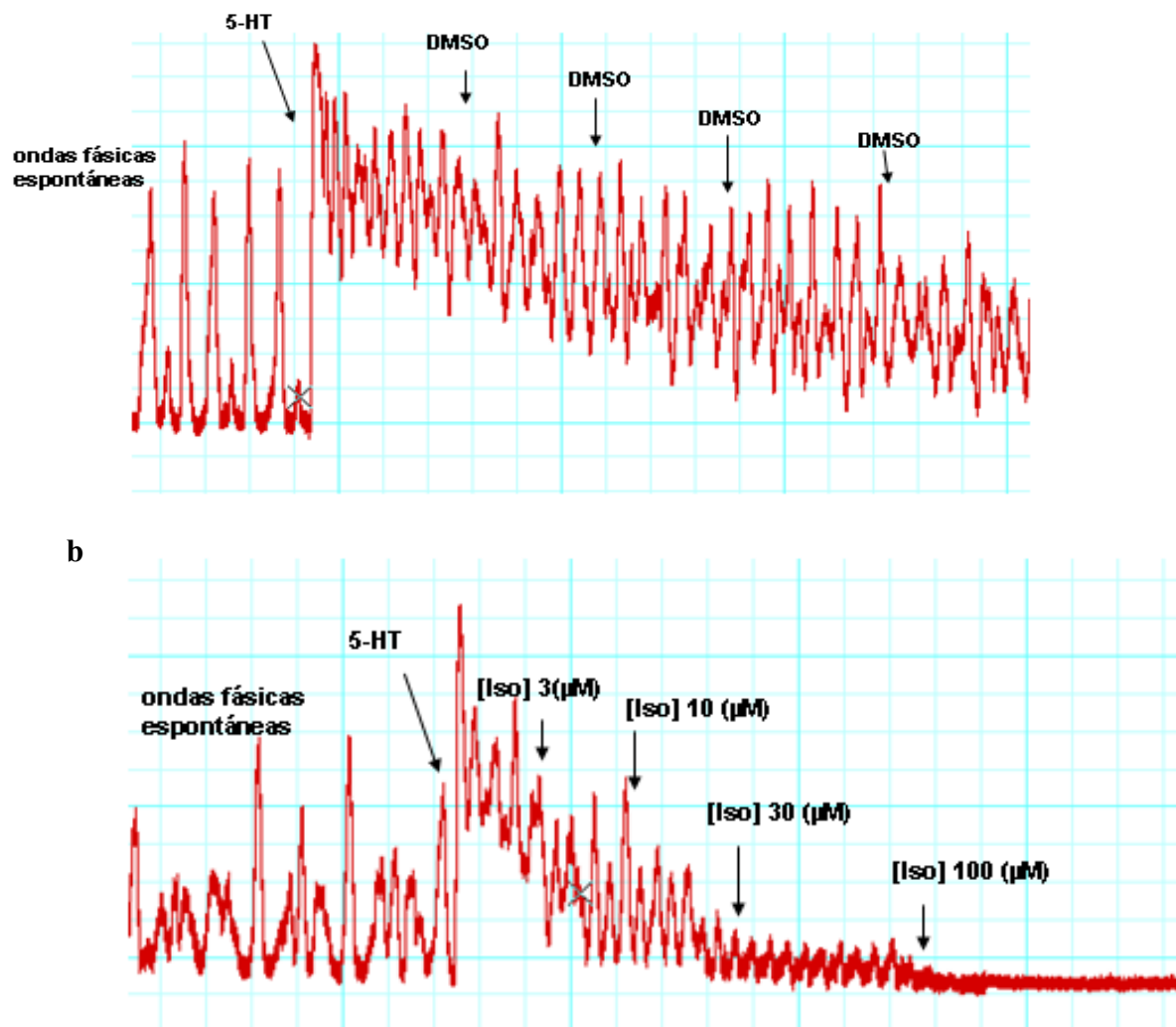


Figura 19: Registros típicos de los efectos de 5-HT en el útero aislado y de la posterior relajación por (a) DMSO y (b) ISO.

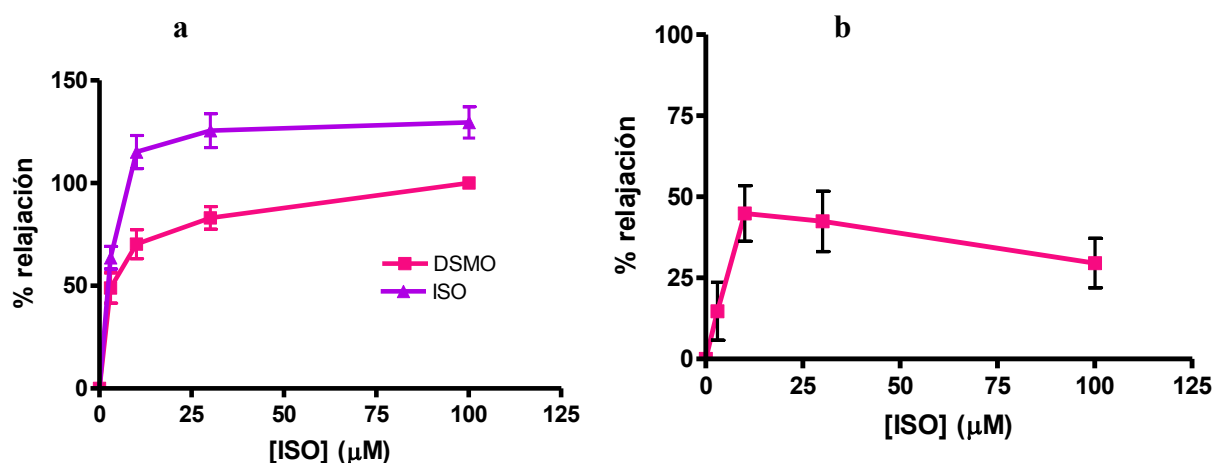
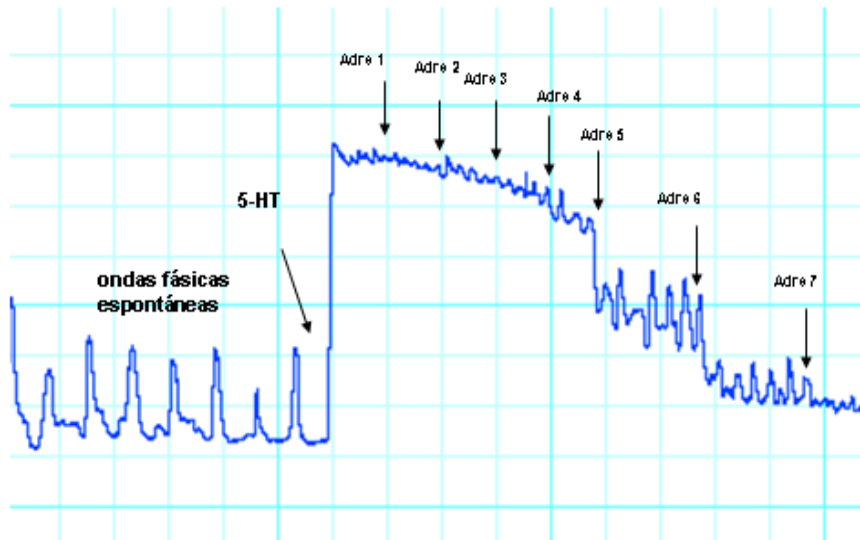


Figura 20: (a) Curva concentración- relajación de DMSO e ISO en similares concentraciones de vehículo (DMSO); (b) Diferencia entre los efectos relajantes de ISO y de DMSO sobre la contractura producida por 5-HT en útero y considerada 100% ($n=12$).

5.1.3.3 Efectos de adrenalina sobre la contractura inducida por 5-HT en útero

Como control positivo se evaluó la relajación producida por adrenalina en concentraciones crecientes y acumulativas partiendo de 0.01 hasta 7 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 21a). La adrenalina relajó totalmente ($96 \pm 2\%$) a la contractura tónica de 5-HT, y se calculó la concentración efectiva al 50% como $\text{CE}_{50} = 1 \pm 0.31 \mu\text{M}$ (Figura 21b).

a



b

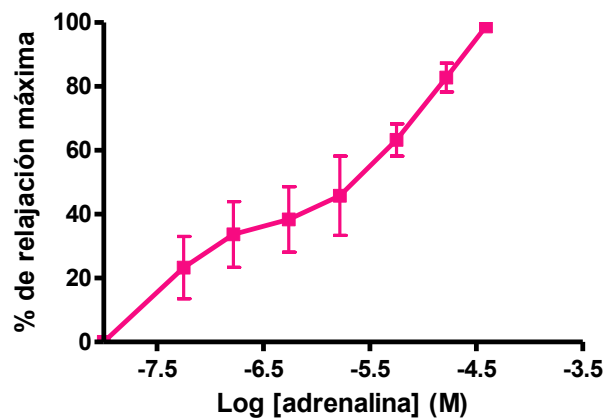


Figura 21: (a) Registro típico del efecto de la adrenalina sobre la contractura producida por 5-HT en útero. La notación Adre 1 a 7 indica los sucesivos agregados acumulativos de la serie: 0.01 a 7 $\mu\text{g/ml}$. (b) Curva concentración-relajación de adrenalina, de la cual se interpola la CE_{50} (ver texto)

5.1.4 Efectos sobre el influjo a través de canales de Ca^{2+}

5.1.4.1 De Isoespiritanol en intestino

Para dilucidar si el ISO actúa inhibiendo el influjo de Ca^{2+} en la célula muscular lisa intestinal, se realizaron CCR de Ca^{2+} en medio despolarizante de alta $[\text{K}^+]$. La Figura 22 muestra que ISO inhibió la CCR de Ca^{2+} , que tuvo un $\text{pCE}_{50} = 2.67 \pm 0.04$ ($n=11$) en forma no competitiva con una constante de afinidad estimada como $\text{pD}'_2 = \text{pK}_{\text{ISO}} = 5.10 \pm 0.1$ ($n=11$) y de $\text{pK}_{\text{ISO}} = 4.65 \pm 0.15$ por el método de Gaddum (Tabla 1). La concentración inhibitoria al 50% (CI_{50}) de ISO en intestino resultó de $35.6 \pm 15.9 \mu\text{M}$.

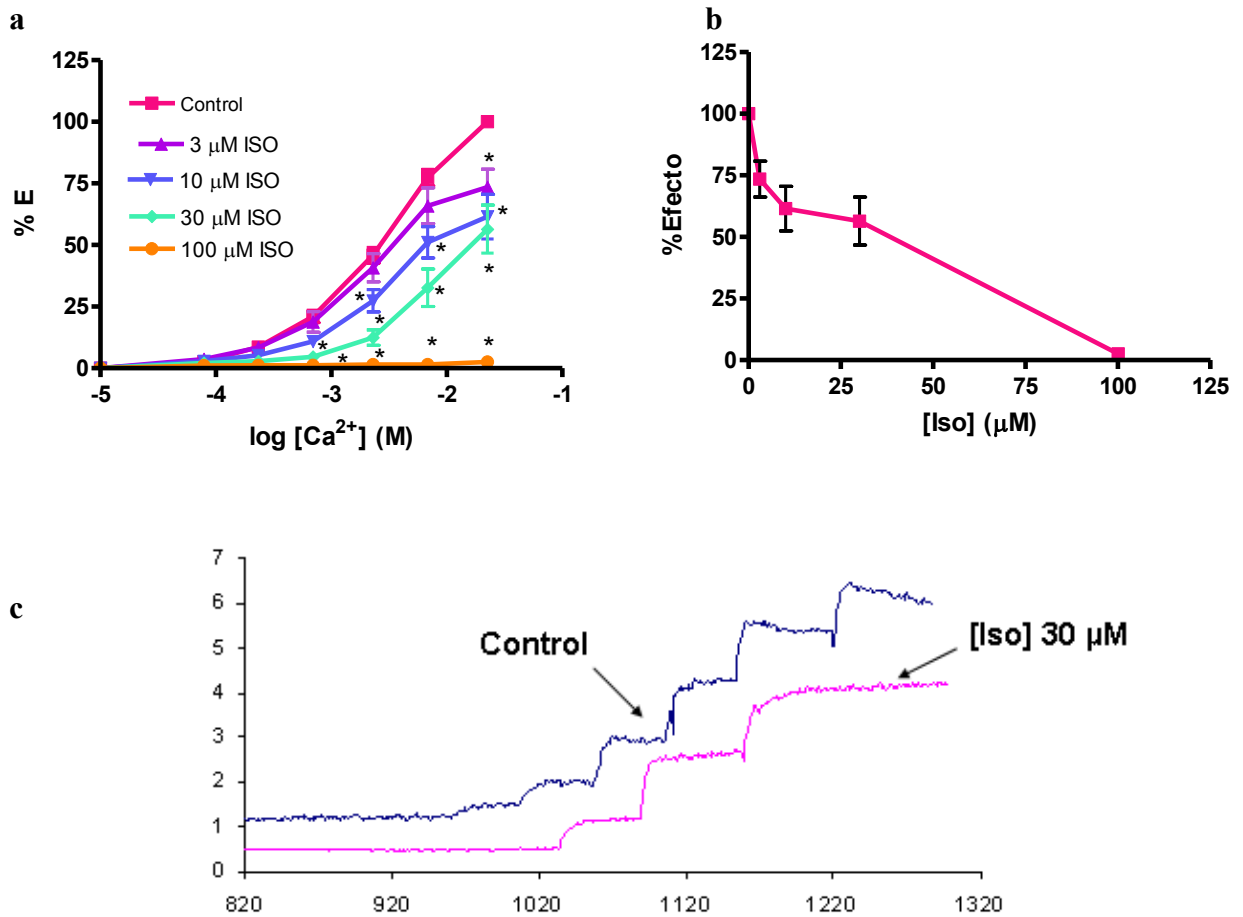


Figura 22: Curva concentración-respuesta de Ca^{2+} en intestino en ausencia y presencia de varias concentraciones en μM de ISO (a) y curva de inhibición (b) donde se observa inhibición completa. En (a): ANOVA de 2 vías: por tratamiento: $F = 89.14$, $p < 0.0001$, por $\log [\text{Ca}^{2+}]$: $F = 182.5$, $p < 0.0001$, post-tests: $*p < 0.05$ vs control), (c) registro típico de CCR- Ca^{2+} en presencia de ISO 30 μM comparado con la CCR control (en ausencia de ISO).

5.1.4.2 De ISO en vejiga

Para dilucidar si el ISO actúa inhibiendo el influjo de Ca^{2+} en la célula muscular lisa de vejiga, se realizaron CCR de Ca^{2+} en medio despolarizante de alta $[\text{K}^+]$. La Figura 23 muestra que ISO inhibió la CCR de Ca^{2+} , que tuvo un $\text{pCE50} = 2.77 \pm 0.09$ ($n=4$), en forma no competitiva con una constante de afinidad calculada como $\text{pD}'2 = \text{pK}_{\text{ISO}} = 4.32 \pm 0.07 \mu\text{M}$ ($n=11$) y $\text{pK}_{\text{ISO}} = 4.23 \pm 0.06$ por el método de Gaddum (Tabla 1). La concentración inhibitoria al 50% (CI50) de Iso en intestino resultó de $98.6 \pm 11.86 \mu\text{M}$.

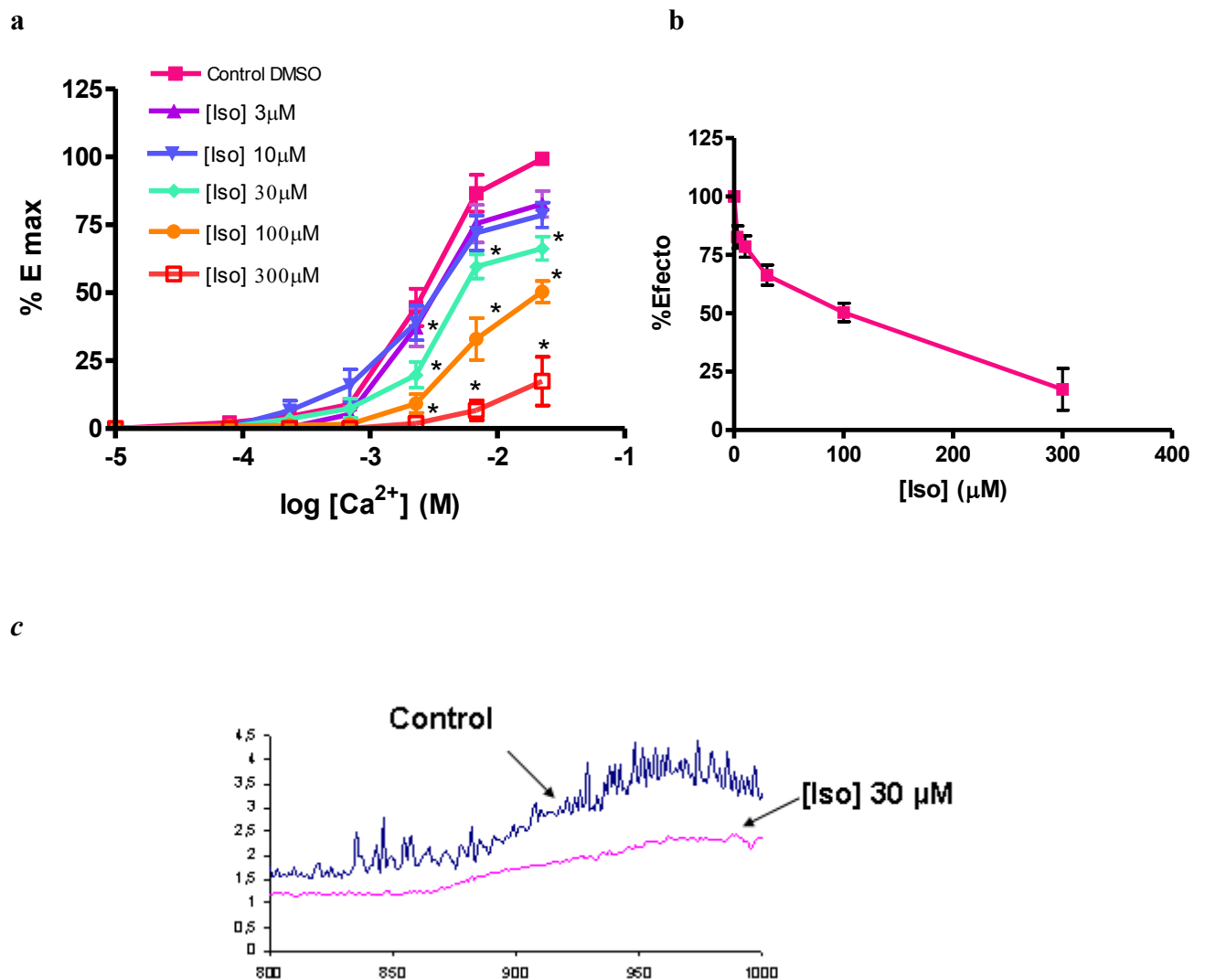


Figura 23: Curva concentración-respuesta de Ca^{2+} en vejiga en ausencia y presencia de varias concentraciones en μM de ISO (a) y curva de inhibición (b). En (a): ANOVA de 2 vías: por tratamiento: $F = 51.50$, $p < 0.0001$, por $\log [\text{Ca}^{2+}]$: $F = 280.0$ $p < 0.0001$, post-tests: $*p < 0.05$ vs control, (c) registro típico de una CCR de Ca^{2+} en presencia de ISO 30 μM comparado con el control (en su ausencia).

5.1.4.3 De TMB en vejiga

Para dilucidar si el TMB actúa inhibiendo el influjo de Ca^{2+} en la célula muscular lisa de vejiga, se realizaron CCR de Ca^{2+} en medio despolarizante de alta $[\text{K}^+]$. La Figura 24 muestra que TMB prácticamente no inhibió la CCR de Ca^{2+} excepto a una concentración muy alta (300 μM), por lo cual no se considera un efecto farmacológico dependiente de la dosis.

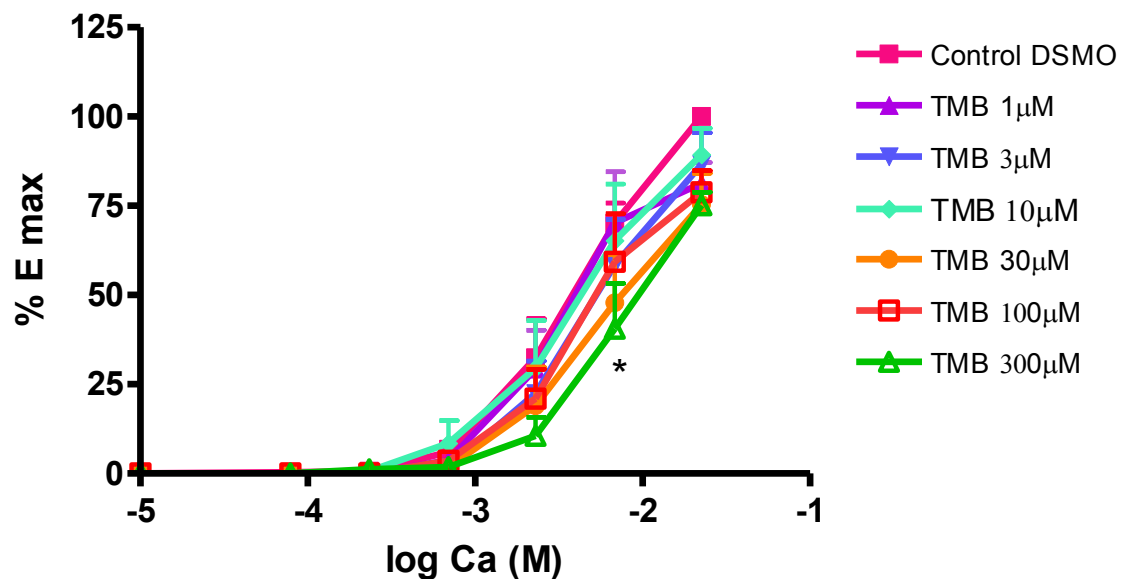


Figura 24: Curva concentración-respuesta de Ca^{2+} en vejiga en ausencia y presencia de varias concentraciones únicas y crecientes de TMB. ANOVA: por tratamiento: $F=2.46$, $p=0.026$, por log Ca: $F=176.3$, $p<0.0001$.

5.1.5 Comparación de las potencias de los antagonistas

Comparando en un mismo gráfico las curvas de inhibición de Isoesintanol y verapamilo sobre las CCR de Ca^{2+} en intestino aislado surge que ISO tiene una potencia inhibidora de la contracción que es menor que la de verapamilo, y mayor que la de TMB (Figura 25).

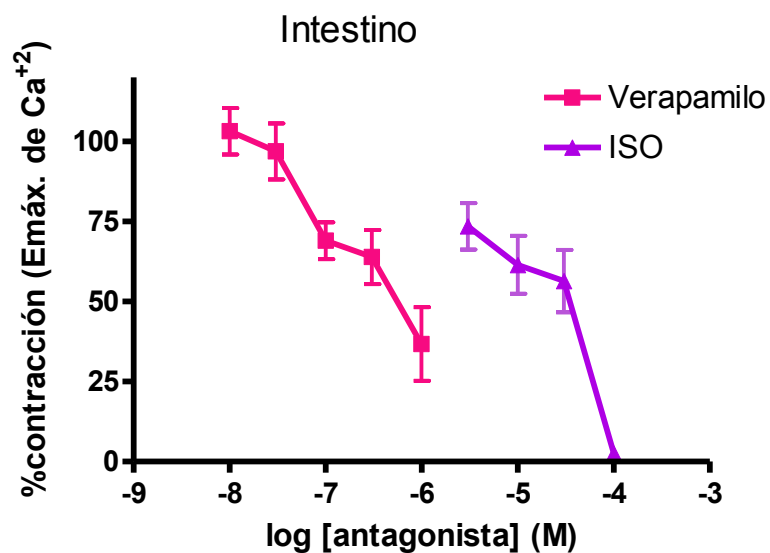


Figura 25: Comparación de las curvas de inhibición del isoespintanol y del verapamil en intestino, obtenidas a partir de las CCR de calcio bajo inhibición no-competitiva, y expresadas en las mismas unidades (mol/L). Puede verse que el verapamil es 50 veces más potente que ISO.

5.2 Actividad citotóxica del Isoespintanol y sus derivados

Esta investigación incluyó una evaluación de viabilidad de los compuestos en macrófagos murinos RAW 264.7. En el ensayo de MTT se muestra la capacidad de reducir la sal MTT a formazán por la succinato deshidrogenasa mitocondrial. El ISO (100 μ M) y DMI (10 y 100 μ M) mostraron significativa disminución de viabilidad de las células cultivadas durante 24 horas, sin embargo, el BrI no produjo pérdida de viabilidad a las concentraciones ensayadas (Figura 26).

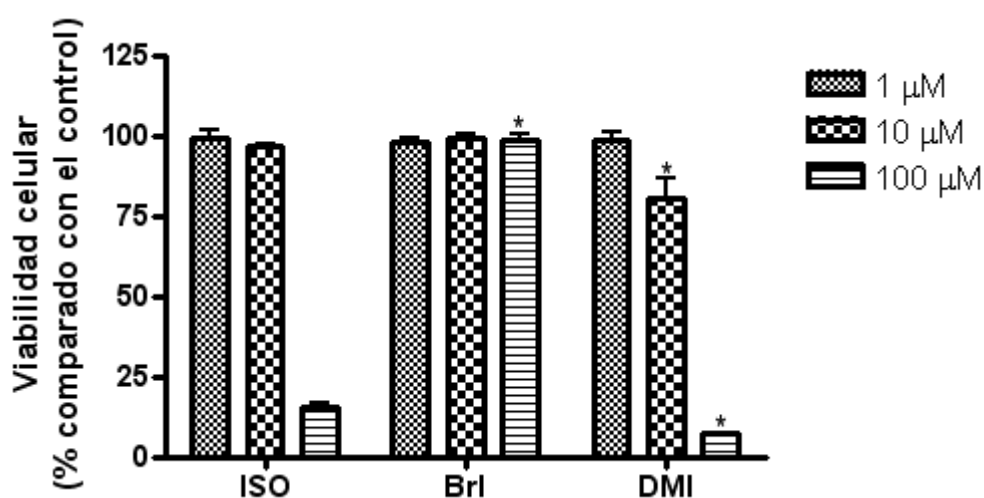


Figura 26. Efectos de Isoespintanol (ISO), bromuro de isoespintanol (BrI) e isoespintanol desmetilado (DMI) sobre la viabilidad celular de macrófagos RAW 264.7. Los valores representan porcentajes de células vivas comparadas con el grupo control tratado con el vehículo (0,5% DMSO). Los datos representan la media y la desviación estándar de tres diferentes experimentos. El símbolo * indica que hay diferencia significativa a la misma concentración de ISO ($P < 0,05$).

La citometría de flujo también fue utilizada para evaluar la citotoxicidad. El método de exclusión de yoduro de propidio se utilizó para evaluar la actividad necrótica y el proceso apoptótico se determinó midiendo el desarrollo de corpúsculos hipodiploides con yoduro de propidio y la exposición de la membrana a fosfatidilserina con anexina.

Las células con disminución de la integridad de la membrana mostraron mayor fluorescencia debido a una afluencia de yoduro de propidio y su unión al ADN. Las células tratadas con DMI mostraron una elevada permeabilidad al yoduro de propidio respecto al control ($29 \pm 2.9\%$ en comparación con el control que fue de $7.2 \pm 0.01\%$, $P < 0.05$). El ISO y BrI no mostraron diferencias con respecto al grupo control (Figura 27).

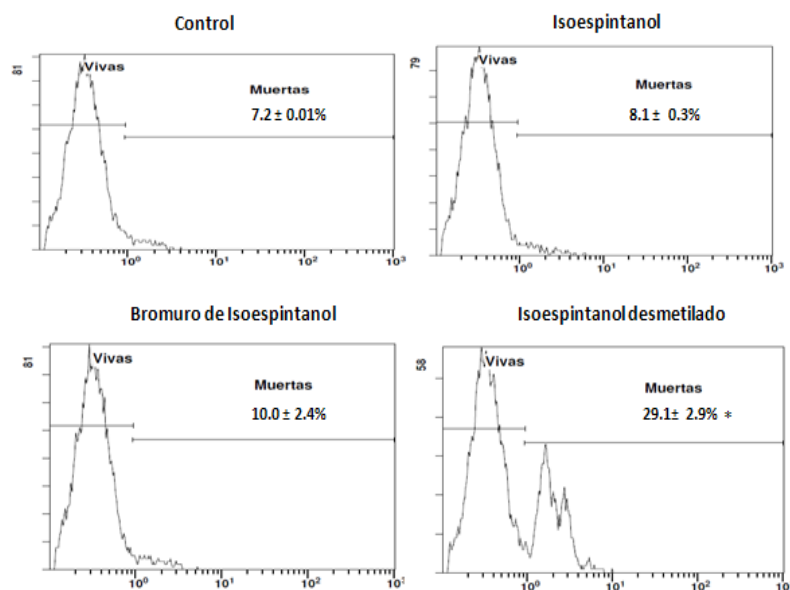


Figura 27. Actividad citotóxica de Isoespintanol y derivados sobre macrófagos RAW 264.7 en el ensayo de exclusión con yoduro de propidio. La figura muestra un típico histograma indicando el porcentaje de células permeables a yoduro de propidio. Los compuestos fueron ensayados a $10 \mu\text{M}$. Los resultados se expresaron como un porcentaje de yoduro de propidio⁺. Los valores se representan como media \pm S.D de tres experimentos independientes. El símbolo * indica diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control ($P < 0,05$).

La distribución relativa del ADN en los macrófagos incubados a $10 \mu\text{M}$ de los compuestos se muestra en Figura 3. La línea en la región sub G0 del histograma indica el rango de células con ADN hipodiploidal, un indicador de apoptosis. Los resultados mostraron que las células en presencia de DMI presentan cambios estadísticamente significativos en el porcentaje de población de células con ADN hipodiploidal ($14,8 \pm 0,4\%$ en comparación con el control que fue de $2,5 \pm 0,4\%$, $P < 0,05$). El ISO y BrI no mostraron diferencias con respecto al grupo control (Figura 28).

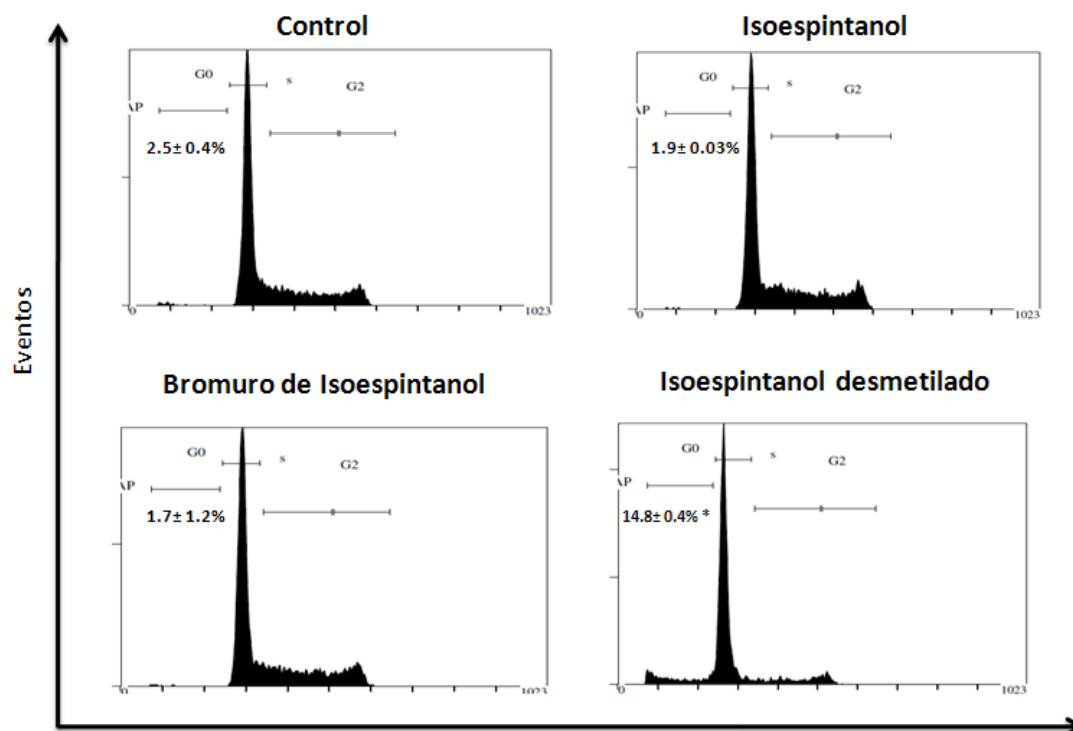


Figura 28. Promoción de apoptosis de isoespintanol y derivados mediante la cuantificación de núcleos hipodiploides por tinción con yoduro de propidio en macrófagos RAW 264.7. La figura muestra un típico histograma indicando el porcentaje de células con el contenido de ADN hipodiploide. Los compuestos fueron ensayados a 10 μ M. Los resultados se expresaron como un porcentaje de yoduro de propidio⁺. Los valores se representan como media \pm S.D de tres experimentos independientes. El símbolo * indica diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control ($P < 0,05$).

La detección de células apoptóticas también se realizó mediante análisis de residuos de fosfatidilserina en la membrana externa por tinción con anexina V-FITC (Isotiocianato de fluoresceína). Los macrófagos fueron tratados con ISO y sus derivados en concentraciones 10 μ M, la proporción de células apoptóticas y necróticas fue significativamente mayor para los macrófagos tratados con DMI (An^+ / PI^- : 8,1 \pm 0,7 % frente al control 4,6 \pm 0,4%, $P < 0,05$) mostrando una distribución típica del proceso apoptótico y (An^+ / PI^+ : 12,6 \pm 0,4 % frente a 2,1 \pm 0,5% de control, $P < 0,05$), comportamiento típico necrótico. El ISO y BrI no mostraron diferencias con respecto al grupo control. (Figura 29).

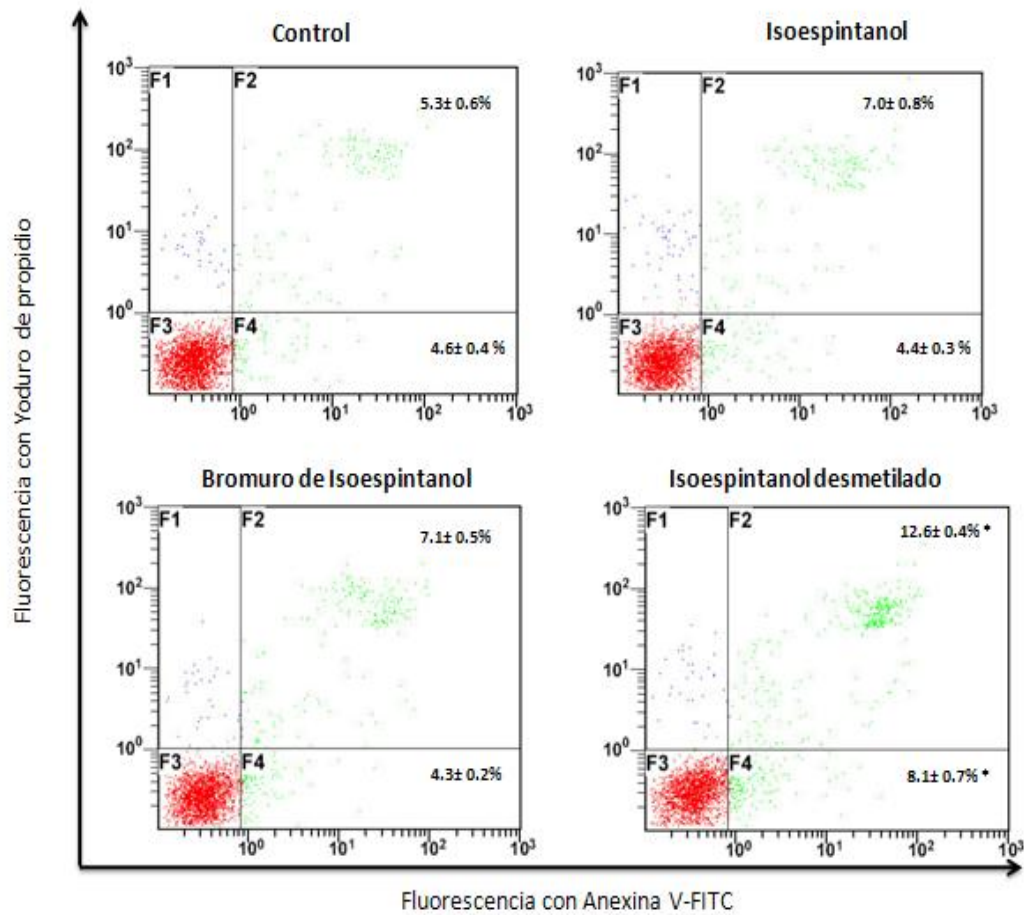


Figura 29. Promoción de apoptosis de isoespintanol y derivados mediante la doble tinción con anexina V (An) y yoduro de propidio (IP) en macrófagos RAW 264.7. Se muestran gráficos de puntos representativos de la tinción celular. El cuadrante izquierdo-inferior (F3) representa la población viva (doble negativo, An^-/IP^-). El cuadrante derecho-inferior (F4) representa la población de células apoptóticas (An^+/IP^-). Finalmente, las células del cuadrante derecho-superior (F2) corresponden a la población de células necróticas (An^+/IP^+). Los compuestos fueron ensayados a 10 μM . Los resultados se expresaron como porcentaje de población. Los valores se representan como media \pm S.D de tres experimentos independientes. El símbolo * indica diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control ($P < 0,05$).

6. DISCUSSION

6.1 Efectos antiespasmódicos del Isoespintanol

Los principios activos aislados a partir de plantas son considerados poderosos agentes terapéuticos, ejemplos claros son digoxina, digitoxina, morfina, reserpina, taxol, vincristina, entre otros. También la hemisíntesis utilizando como precursor algún compuesto de la biosíntesis de una planta es una estrategia para producir nuevas estructuras y fármacos con baja toxicidad y alta actividad como por ejemplo metformina, estatinas y warfarina (Hota, 2007). En base a esto se estudió en la presente tesis un compuesto aislado previamente de una planta y sus dos derivados semisintéticos.

La familia Annonaceae está ampliamente distribuida y en la actualidad se están realizando estudios fitoquímicos principalmente en la búsqueda de alcaloides los cuales son los que se encuentran en mayor cantidad. También contiene compuestos no alcaloideos que están presentes en menor proporción, y podrían presentar importantes actividades (Carneiro y col., 2015). Una de las especies de esta familia a la cual se le atribuyen actividades antiespasmódicas, antiinflamatoria y antiséptica es *Oxandra lanceolata* (Scull Lizama y col., 1998). En base al enfoque filogenético es posible pensar que los metabolitos secundarios presentes en una especie como ésta podrían estar presentes en otra especie de la misma familia. Por lo tanto, se hipotetizó que la especie *Oxandra xylopioides* podría tener actividades antiespasmódicas y antiinflamatoria.

En particular, en esta tesis se estudió el metabolito secundario Isoespintanol (ISO), un principio activo aislado previamente por Rojano y colaboradores en el 2007, a partir de un extracto hexánico de hojas de *Oxandra xylopioides*. La similitud estructural del ISO con los antiespasmódicos comerciales floriglucinol (Phg) y trimetoxibenceno (TMB) generó la hipótesis de que el ISO podría tener las actividades antiespasmódicas.

Los compuestos Phg y TMB son empleados en la actualidad comercialmente en terapéutica asociados en formulaciones orales e inyectables, para tratar espasmos biliares, urinarios y uterinos, generalmente en caso de cálculos (Boukef y col. 2010; Laboratorios Elea,

1996). A pesar de su uso comercial, el Phg demostró tener propiedades anticolinérgicas no competitivas en las fibras musculares lisas de intestino en estado de espasmo, pero resultó inactivo en la CCR de carbacol en vejiga. El TMB, que es un derivado de Phg sintetizado con el objetivo de prolongar la acción de este último, se ha descrito con similares propiedades farmacológicas, diferenciándose sólo en la potencia y duración del efecto (Dellabella y col., 2005; Laboratorios Elea, 1996; Goswami y col., 2016; Zhuang y col., 2003). En la presente tesis, TMB fue 8 veces menos potente que Phg en intestino, y generó efecto antiespasmódico en vejiga, en ambos casos por inhibición no-competitiva sobre el receptor muscarínico estimulado por carbacol.

El mismo tipo de bloqueo no-competitivo demostró tener ISO, con un pK_{ISO} de 4.78 ± 0.09 en intestino y 4.60 ± 0.09 en vejiga. En comparación con ambos compuestos de origen comercial, el ISO resultó 8 veces más potente que TMB y similarmente potente que Phg en intestino, con una inhibición máxima de la contracción de las CCR siguiendo el orden $ISO > TMB > Phg$ (Figura 10). En vejiga, el ISO resultó 8 veces más potente que TMB e inhibió más a la CCR de Cbl que el TMB, mientras que Phg no fue antiespasmódico (Figura 17).

En útero, el ISO redujo la CCR de 5-HT de manera no competitiva y completa. La CI_{50} ($13.7 \mu M$) fue similar a las obtenidas en la curva de relajación de la contractura tónica de 5-HT en útero ($7.1 \mu M$), la curva de relajación de la contractura de carbacol en vejiga ($11.5 \mu M$) y la CCR de carbacol en intestino ($12.5 \mu M$). La constante de afinidad pK_{ISO} en útero fue de 5.05 ± 0.06 , la cual resultó similar a la obtenida en intestino y vejiga (ver antes). Las similitudes sugieren que el sitio de acción del ISO es independiente del agonista y de su receptor (carbacol en receptores $M3$ o 5-HT en receptores 5-HT₂), y del tejido (los cuales difieren en el número de receptores y en la amplificación de la señal de transducción intracelular) (Kenakin, 2014).

En conclusión, los resultados permitieron comprobar la hipótesis I pues el Isoespintanol produjo un efecto antiespasmódico más intenso y potente que TMB y Phg, y su mecanismo involucraría un sitio común a todos los tejidos y agonistas.

6.1.1 Mecanismo de acción

Respecto al mecanismo de acción responsable de los efectos antiespasmódicos, ISO también inhibió en modo no competitivo y completo a la CCR de Ca^{2+} en intestino y en vejiga, con un pK_{ISO} calculado como $\text{pD}'2$ de 5.1 ± 0.1 y $\text{pK}_{\text{ISO}} = 4.65 \pm 0.15$ por el método de Gaddum en intestino. En vejiga la constante de afinidad de ISO frente a la CCR de Ca^{2+} fue algo menor, con $\text{pD}'2$ de 4.32 ± 0.07 y $\text{pK}_{\text{ISO}} = 4.23 \pm 0.06$ según el método de Gaddum. La Tabla 1 muestra que hay una completa concordancia entre los valores obtenidos con los dos métodos de cálculo, tanto para la pK_{ISO} como para la pK de verapamilo (pK_{Vpl}) en los diversos protocolos. Por lo tanto, se concluye que los dos métodos son equivalentes para estimar la constante de afinidad de un antagonista no-competitivo.

Un similar comportamiento de antagonismo no-competitivo fue desarrollado por verapamilo sobre la CCR de un agonista colinérgico y en la CCR de Ca^{2+} , tanto en intestino como en vejiga. Sin embargo, el verapamilo resultó tener mayor afinidad que ISO, puesto que su $\text{pD}'2$ fue 6.50 ± 0.11 frente a Ca^{2+} y 6.22 ± 0.16 frente a acetilcolina en intestino (Blanco y col., 2013), y fue 5.80 ± 0.13 frente a Cbl en vejiga. Estos valores son acordes con datos previos que estimaron una afinidad de alrededor de $1 \mu\text{M}$ para verapamilo (Ishii y col., 1985). Al igual que ISO, la similitud en el pK de verapamilo frente a los diversos agonistas sugiere un sitio común de inhibición de la contracción. Puesto que verapamilo es un conocido bloqueante de los canales de Ca^{2+} que se une al canal internamente en un sitio diferente al de unión del Ca^{2+} (Spedding, 1985), es razonable que aparezca un patrón de inhibición no-competitiva en las CCR de Ca^{2+} obtenidas en medio despolarizante. Por lo tanto, la comparación con los resultados de ISO en las CCR de Ca^{2+} sugiere que éste podría ser también un bloqueante no-competitivo de los canales de Ca^{2+} .

Si bien el antagonismo no-competitivo podría deberse a una activación de los canales de K^+ (tipo pinacidil, nicorandil u otro abridor de canales de K^+) el hecho de que ISO conservara la

inhibición no competitiva en las CCR de Ca^{2+} obtenidas en medio de alta $[\text{K}]$ (que minimiza el eflujo de K^+) sugiere que no está actuando por dicho mecanismo.

A pesar de que ISO resultó unas 70 veces menos afín y 50 veces menos potente que verapamilo frente al Ca^{2+} en intestino (Figura 25) éste no se emplea como antiespasmódico visceral debido a sus efectos adversos cardiovasculares como hipotensión, mareos y palpitaciones. En cambio, de los 3 antiespasmódicos ensayados, sólo ISO fue antagonista no-competitivo de la CCR de Ca^{2+} . Este mecanismo puede ser la base de la mayor potencia antiespasmódica del ISO en comparación con TMB y Phg, que parecen no interferir con el influjo de Ca^{2+} al músculo liso intestinal y de vejiga.

Por otra parte, la CI_{50} de ISO estimada sobre la contractura tónica de Cbl en vejiga fue casi la mitad ($11.5 \mu\text{M}$) de la necesaria para inhibir la CCR de Cbl ($38.6 \mu\text{M}$) en la cual se miden predominantemente las respuestas fásicas. En cambio, para inhibir las espigas contráctiles evocadas por estímulo eléctrico de campo en la vejiga se requirió la misma concentración ($35 \mu\text{M}$) de ISO que en las CCR, inhibiéndose sólo un 44%. Las diferencias en la sensibilidad a ISO podrían depender del mecanismo desencadenante de las respuestas tónica y fásica inducidas por carbacol (en M3): la respuesta tónica es más sensible al influjo de Ca^{2+} que la respuesta fásica característica de las CCR y de las espigas evocadas por estímulo eléctrico. Como se expuso en la Introducción (1.6.4) éstas dependen de la activación y posterior inactivación de los canales de K^+ , principalmente BK, que controlan la excitabilidad y contractilidad del detrusor, manteniendo el potencial de reposo para la alternancia entre la activación de canales de Ca^{2+} tipo L y la fase de repolarización, al igual que lo desencadenado en los potenciales de acción espontáneos que determinan la automaticidad (Philypov y col. 2016). Aunque todas las contracciones involucran activación de canales de Ca^{2+} que son sensibles a ISO, es posible que difieran en el número de canales o en su umbral de activación para el agonista o el estímulo eléctrico.

En cuanto al mecanismo participante en el útero expuesto a contractura tónica de 5-HT, el

ISO indujo una relajación (45%) (Figura 20) menor que la adrenalina (96%) (Figura 21), y fue 7 veces menos potente lo cual sugiere que ambos actúan en diferentes mecanismos, tales como la estimulación del receptor β -adrenérgico versus el bloqueo del influjo de Ca^{2+} .

En conclusión, el isoespintanol interfirió con el influjo de Ca^{2+} disparado por agonistas en los 3 tejidos de músculo liso visceral estudiados. Su patrón de comportamiento frente a carbacol fue similar al de verapamilo, un antagonista no-competitivo de los canales de calcio, pero fue 40 veces menos potente en vejiga y 9 veces menos potente en intestino. Sin embargo, es importante destacar que en la terapéutica se buscan fármacos poco potentes para reducir la incidencia de efectos adversos en otros tejidos. Un claro ejemplo apareció con fármacos que tenían acciones combinadas de anticolinérgico y antagonista de calcio, que actúan sinérgicamente para reducir las contracciones de la vejiga anormales causadas por la inestabilidad o hiperreflexia del detrusor. El fármaco más representativo de esta clase es la oxibutinina que tiene potente actividad anticolinérgica y débil actividad antagonista de calcio (Hamada y col. 1997). Así se logran reducir los efectos adversos por la baja actividad de cada uno de esos mecanismos por separado, y sinergizar el efecto terapéutico por la combinación. Análogamente, el ISO parece ofrece una alternativa terapéutica basada en la inhibición del influjo de Ca^{2+} evitando los efectos adversos del antagonismo colinérgico muscarínico (xerostomía, visión borrosa, sedación, constipación, entre otros). Será necesario realizar un protocolo de administración *in vivo* para evaluar la posible incidencia de hipotensión como efecto adverso del bloqueo del influjo de Ca^{2+} .

6.2 Actividad citotóxica

La inflamación es una respuesta fisiopatológica compleja generada por diferentes estímulos. Diferentes mediadores están involucrados en dicha respuesta en la evolución y resolución de este proceso, como por ejemplo aminas vasoactivas, metabolitos araquidónicos, mediadores pépticos y radicales libres (Simmons, 2006).

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) se encuentran entre los medicamentos más

prescriptos en todo el mundo, se incluye la aspirina y varios otros agentes inhibidores de la ciclo-oxigenasa (COX). Estudios clínicos indican que los inhibidores selectivos de la COX-2 ejercen importantes efectos cardiovasculares adversos, que incluyen aumento del riesgo de infarto del miocardio, accidente cerebrovascular, insuficiencia cardíaca, insuficiencia renal y hipertensión arterial (Batlouni, 2009).

Los corticoides son los antiinflamatorios más eficaces y son efectivos inmunosupresores, sin embargo favorecen la diseminación de infecciones y desencadenan muchos efectos adversos a nivel óseo, hormonal, sistema nervioso central y en casi todo el organismo, por ello deben reservarse sólo para aquellos casos que otros fármacos son ineficaces o contraindicados (Aron y col, 2007).

Las plantas de la familia Annonaceae han demostrado capacidad antiinflamatoria con algunos de sus compuestos pertenecientes al grupo de los alcaloides, al inhibir a las enzimas pro-inflamatorias y además por su capacidad antioxidante (Ríos y col., 2000). En trabajos recientes se demostró la actividad antiinflamatoria *in vivo* e *in vitro* de compuestos aislados de *O. xylopiodes* (Rojano y col., 2007; Aquila y col., 2009). El ISO, objeto de estudio de esta tesis, posee la capacidad al reducir en un 43% el edema en pata de ratón inducida por carragenina en 3 horas y también en macrófagos murinos estimulados con LPS redujo la producción de IL1 β y la síntesis de ARNm IL1 β (Rojano y col., 2007).

La limitación de fármacos antiinflamatorios disponibles en el mercado para el tratamiento de determinados procesos inflamatorios ha llevado en los últimos años a proponer nuevas estrategias farmacológicas alternativas que podrían utilizarse para la resolución de la inflamación mejorando la apoptosis de las células PMN sin afectar la función de los macrófagos (Hallett y col., 2008).

Galeano y colaboradores (2010), con objetivo de mejorar la actividad antioxidante del ISO, obtuvieron mediante un proceso de semisíntesis dos compuestos, BrI y DMI, con los cuales se pudieron realizar otros ensayos biológicos, tal como evaluar el efecto inhibidor de la

polifenoloxidasas extraídas del banano (Gil Garzón y col., 2011).

Recientemente, se estudió la actividad apoptótica *in vitro* del ISO y los dos derivados semisintéticos BrI y DMI en PMN humanos. Este estudio, se demostró que el BrI, induce un proceso apoptótico en PMN y está mediado al menos en parte por la activación de las caspasas (Dade y col., 2016).

En el presente trabajo, se ha demostrado que el ISO y el BrI no resultan citotóxicos en macrófagos murinos. Por lo contrario, el DMI lo fue, mostrando un mecanismo apoptótico de muerte celular. Este último resultado podría considerarse para la evaluación *in vitro* de su potencial antitumoral utilizando diferentes líneas celulares derivadas de neoplasias humanas.

La hipótesis II formulada en este trabajo ha sido verificada, por lo expuesto, los datos aportados por esta tesis nos permiten concluir que el BrI no afecta la viabilidad de los macrófagos y posee la capacidad de inducir apoptosis en PMN humanos. Si bien debe considerarse las limitaciones propias de los modelos experimentales utilizados, este hecho convierte potencialmente al BrI en un fármaco que podría intervenir en la etapa de la resolución del proceso inflamatorio mejorando la apoptosis de las células PMN sin afectar la función de los macrófagos.

Estamos de acuerdo en que la extrapolación *in vivo* de los resultados obtenidos en células cultivadas con un compuesto es problemático, por tal razón, serán necesarios estudios adicionales centrados en los posibles mecanismos de acción de este compuesto así como su potencial actividad anti-inflamatoria en modelos *in vivo*.

De este modo, con la cautela que corresponde, es posible proyectar una aplicación del BrI en el tratamiento farmacológico de procesos inflamatorios en que los fármacos disponibles en el mercado presentan limitaciones en cuanto a su eficacia y seguridad.

7. CONCLUSIONES

- La presente tesis demuestra que el Isoespintanol es un buen antiespasmódico, actuando como antagonista no competitivo ante las contracciones inducidas por carbacol en intestino y vejiga y las contracciones inducidas por 5-HT en útero.
- La potencia y máxima relajación de ISO fueron mayores que las de los antiespasmódicos comerciales TMB y Phg.
- Los resultados demuestran que el mecanismo de acción de ISO es la interferencia con el influjo de calcio al músculo liso visceral, efecto que no presentaron TMB y Phg.
- El ISO mostró un patrón de interferencia con el influjo de Ca^{2+} en modo no-competitivo similar a verapamilo, pero frente a carbacol fue 40 veces menos potente que éste en vejiga y 9 veces menos potente en intestino.
- El Isoespintanol y el Bromuro de isoespintanol demostraron no ser citotóxicos a concentraciones menores de 10 μM en el modelo experimental utilizado y por ende no afectaron la viabilidad de los macrófagos RAW 257,4. En las mismas condiciones experimentales, el Isoespintanol desmetilado presentó citotoxicidad para macrófagos mediante un mecanismo apoptótico.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Aaronson P., Sarwar U., Gin S., Rockenbach U., Connolly M., Tillet A., Watson S., Liu B., Tribe R. (2006). A role for voltage-gated, but not Ca²⁺-activated, K⁺ channels in regulating spontaneous contractile activity in myometrium from virgin and pregnant rats. *British Journal of Pharmacology* 147, 815–824.
- Alcaraz M., Calixto J., Delgado R. (2002). Técnicas in vitro para el estudio de fármacos antiinflamatorios. CYTED, Subprograma X, Proyecto X.6. España.
- Almeida J., Araújo E., Ribeiro L., Lima J., Nunes X., Lúcio A., Agra M., Barbosa-Filho J. (2012). Antinociceptive activity of ethanol extract from *Duguetia chrysocarpa* Maas (Annonaceae). *The Scientific World Journal*, 1–6.
- Andersson K.E. (2003). Storage and voiding symptoms: pathophysiologic aspects. *Urology* 62, 3–10.
- Andersson K.E. (2004). Antimuscarinics for treatment of overactive bladder. *The Lancet Neurology* 3, 46–53.
- Andersson K.E., Arner A. (2004). Urinary bladder contraction and relaxation: physiology and pathophysiology. *Physiological Reviews* 84, 935–986.
- Aquila S., Rojano B., Recio M.C., Giner R.M., Schinella G., Debenedetti S.L., Saez J., Rios J.L. (2009). Anti-inflammatory activity of berenjenol and related compounds. *Planta Medica* 75, 18–23.
- Arango J., Cortés D., Cavé A., Kasels B., Mérienne C. (1987_a). Three Bis-Dehydroaporphines from *Oxandra cf. major*. *Phytochemistry* 36: 1227-1229.
- Arango J., Cortés D., Cavé A. (1987_b). Azafluorenones from *Oxandra cf. major* and biogenetic considerations. *Phytochemistry* 26, 2093-2098.
- Aránguiz D. (2006). Autofagia del cardiomiocito: Un Nuevo mecanismo de adaptación al estrés o de muerte celular. *Revista Chilena de Cardiología* 25, 331-338.

Bae J.S. (2011). Antithrombotic and profibrinolytic activities of phloroglucinol. *Food and Chemical Toxicology* 49,1572-1577.

Blanco M., Colareda G.A., Baren C., Bandoni A., Ringuelet J., Consolini A.E. (2013). Antispasmodic effects and composition of the essential oils from two South American chemotypes of *Lippia alba*. *Journal of Ethnopharmacology* 149, 803-809.

Boukef R, Claessens Y.E., Boudia W, Grissa M.H., Beltaief K, Trimech M.N., Kerkeni W, Boudhib L, Nouira S. (2010). Phloroglucinol as an adjuvant analgesic to treat renal colic. *American Journal of Emergency Medicine* 28, 720-723.

Brunton L, Lazo J, & Parker K (2014). Goodman & Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. XII edición. Editorial Mc Graw Hill, 240-246.

Buja M., Eigenbrodt M., Egenbrodt E. (1993). Apoptosis and necrosis. Basic types and mechanism of cell death. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 117, 1208-1214.

Carneiro A, Guedes J, Vasconcelos E, Fachine J, & Barbosa J. (2015). Alkaloids of the Annonaceae: occurrence and a compilation of their biological activities. *The Alkaloids: Chemistry and Biology* 74, 233-409.

Castro C. & Rivera D. (1991). Plantas Medicinales de Nuestra Región. Editorial Regional de Murcia. *Medicinal plants*, 10-12.

Chatrou L., Pirie M., Erkens R., Couvreur T., Neubig K., Abbott J., Mols J., Maas J., Saunders R., Chase M. (2012). A new subfamilia and tribal classification of the pantropical flowering plant family Annonaceae informed by molecular phylogenetics. *Botanical Journal of the Linnean Society* 169, 5–40.

Colares M., Muguerza A., Rosella M.A., Consolini A.E. (2013). Antispasmodic effects of *Mikania micrantha* Kunth and dual gastrointestinal effect of *Mikania cordifolia* (L.F.) Willd (asteraceae) on isolated rat thin intestine. *Pharmacologyonline* 2, 1-11.

Consolini AE., Berardi A., Rosella M., Volonté G. (2011). Antispasmodic effects of *Aloysia polystachya* and *A. gratissima* tinctures and extracts are due to non-competitive inhibition of intestinal contractility induced by acetylcholine and calcium. *Brazilian Journal of*

Pharmacognosy 21, 889-900.

Coria A, Montalvo E, Yahia E, Obledo E. (2016). *Annona muricata*: A comprehensive review on its traditional medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity. *Journal of Arabian Chemistry*, 15-25.

Dade M., Galeano P., Ríos J.L., Rojano B., Schinella G. (2016). Apoptotic activity of Isoespinanol derivatives in human polymorphonuclear cells. *VITAE, Revista de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y alimentarias* 23, 11-17.

De Carvalho H.A, Vasconcelos B.P., Leite T, Araújo B., Correia A. (2014). Main ion channels and receptors associated with visceral hypersensitivity in irritable bowel syndrome. *Annals of Gastroenterology* 27, 200-206.

De la Fuente J., Fernandez A., Cuevas P., Gonzales R., Xiang M., Angulo J. (2014). Stimulation of large-conductance calcium-activated potassium channels inhibits neurogenic contraction of human bladder from patients with urinary symptoms and reverses acetic acid-induced bladder hyperactivity in rats. *European Journal of Pharmacology* 735, 68-76.

Dellabella M., Milanese G., Muzzonigro G. (2005). Randomized trial of the efficacy of tamsulosin, nifedipine and phloroglucinol in medical expulsive therapy for distal ureteral calculi. *Journal of Urology* 174, 167-172.

Emendorfer F., Bellato F., Noldin V.F., Niero R., Cechinel-Filho V., Cardozo A.M. (2005). Evaluation of the relaxant action of some Brazilian medicinal plants in isolated guinea-pig ileum and rat duodenum. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 8, 63-68.

Farrell G., Van Rooyen D., Gan L., Chitturi S. (2012). NASH is an inflammatory disorder: pathogenic, prognostic and therapeutic implications. *Gut and Liver* 6, 149-164.

Fry C.H., Ikeda Y., Harvey R., Wu C., Sui G.P. (2004). Control of bladder function by peripheral nerves: avenues for novel drug targets. *Urology* 63, 24-31.

Galbis A. (2004). Panorama actual de la Química Farmacéutica. Universidad de Sevilla. Segunda

edición. Sevilla-España. p: 205-210.

Galeano P., Gil M., Gil J., Otalvaro L., Sáenz J., Rojano B. (2010). Synthesis and antioxidant activity of two isoespintanol derivatives. *Revista Colombiana de Química* 39, 173-180.

Gil Garzón M., Rojano B., Guerreiro Erazo C. (2011). Inhibición de la polifenoloxidasas extraída del banano (cavendish) por medio de algunos derivados del isoespintanol en Desarrollo y Transversalidad, Serie Lasallista Investigación y Ciencia. p. 243-248. ISBN: 978-958-8406-14

Gleichmann M., Buchheim G., El-Bizri H., Yokota Y., Klockgether T., Kügler S., Bähr M., Weller M., Schulz J.B. (2002). Identification of inhibitor-of-differentiation 2 (Id2) as a modulator of neuronal apoptosis. *Journal of Neurochemistry* 80, 755-762.

Goswami S.K., Gangadarappa S.K., Vishwanath M., Razdan R., Jamwal R., Bhadri N., Inamdar M.N. (2016). Antioxidant Potential and Ability of Phloroglucinol to Decrease Formation of Advanced Glycation End Products Increase Efficacy of Sildenafil in Diabetes-Induced Sexual Dysfunction of Rats. *The Journal of Sexual Medicine* 4, 104-112.

Gottsberger G. (1999). Pollination and evolution in neotropical Annonaceae. *Plant Species Biology* 14, 143-152.

Hallett J., Leitch A., Riley N., Duffin R., Rossi A. (2008). Novel pharmacological for driving inflammatory cell apoptosis and enhancing the resolution of inflammation. *Trends in Pharmacological Sciences* 29, 250-259.

Hamada K., Sasaki Y., Taniguchi N., Fukui H., Miyatsuka Y., Kimura Y., Ukai Y., Yoshikuni Y., Kimura K. (1997). Anticholinergic and Calcium Antagonistic Activities of NS-21 Contribute to the Inhibition of Rat Urinary Bladder Contractions. *General Pharmacology* 5, 771-778.

Hashitani H., Brading A.F., Suzuki H. (2004). Correlation between spontaneous electrical, calcium and mechanical activity in detrusor smooth muscle of the guinea-pig bladder. *British Journal of Pharmacology* 141, 183-193.

Hegde S. & Eglen R. (1999). Muscarinic receptor subtypes modulating smooth muscle

contractibility in the urinary bladder. *Life Science* 64, 419-428.

Hernández J., Volpato G. (2004). Herbal mixture in the traditional medicine of Eastern Cuba. *Journal of Ethnopharmacology* 90, 293-316.

Hernández R. & Gally M., (1981). Plantas Medicinales: Usos y dosificación de las Plantas más usadas en América Latina. Editorial PAX México. *Botanical-Medical*, p: 7-8.

Herrera G.M., Pozo M.J., Zvara P., Petkov G.V., Bond C.T., Adelman J.P., Nelson M. T. (2003). Urinary bladder in stability induced by selective suppression of the murine small conductance calcium-activated potassium (SK3) channel. *The Journal of Physiology* 551, 893–903.

Hocquemiller R., Cortés D., Arango G., Myint S., Cavé A., Angelo A. (1991). Isoelement et synthèse de l'espintanol, nouveau monoterpène antiparasitaire. *Journal of Natural Products* 54, 445-452.

Homburg C., Dehaas M., Vondemborne A., Verhoave A., Reutingsperger C., Roos C. (1995). Human neutrophils lose their surface FcγR111 and acquire Annexin V binding sites during apoptosis in vitro. *Blood Journal* 85, 532– 540.

Hota D. (2007). Bioactive Medicinal Plants. *Gene-Tech-Book*, p: 73-78.

Hutchinson J. (1974). The Genera of Flowering Plants. University Press-Oxford, 123-125.

Ishii K., Taira N., Yanagisawa T. (1985). Differential antagonism by Bay K 8644, a dihydropyridine calcium agonist, of the negative inotropic effects of nifedipine, verapamil, diltiazem and manganese ions in canine ventricular muscle. *British Journal of Pharmacology* 84, 577–584.

Karamenderes C., Apaydin S. (2003). Antispasmodic effect of *Achillea nobilis* L. subsp. *sipylea* (O. Schwarz) Bassler on the rat isolated duodenum. *Journal of Ethnopharmacology* 84, 175-179.

Kenakin T.P. (1984). The classification of drugs and drug receptors in isolated tissues. *Pharmacological Reviews* 36, 165-222.

Kenakin T.P. (2014). A Pharmacology Primer. 4th Edition. Elsevier, Academic Press, 361-363.

- Kerr J.F.R., Wyllie A., Currie A. (1972). Apoptosis: a basic biologic phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* 26, 239-257.
- Kitchen I. (1984). Textbook of in Vitro Practical Pharmacology. Blackwell Scientific Publications. ISBN: 0-632-01216-1.
- Kuklinski C. (2003). Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Editorial Omega, p: 25-30.
- Kura H., Obara K., Yabu H. (1992). Contractile responses to electrical field stimulation ant ATP in Guinea pig urinary bladder. *Journal of Physiology and Biochemistry* 102C, 193.197.
- Leboeuf M., Cavé A., Bhaumik P.K., Mukherjee B., Mukherjee R. (1980). The phytochemistry of the Annonaceae. *Phytochemistry* 21, 2783 – 2813.
- Lebrini M., Robert F., Lecante A., Roos C. (2011). Corrosion inhibition of C38 steel in 1 M hydrochloric acid medium by alkaloids extract from *Oxandra asbeckii* plant. *Corrosion Science* 53, 687–695.
- Leist M., Jaattela M. (2001). Fourdeaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2, 589-598.
- Leitch A.E., Duffin R., Haslett C., Rossi A.G. (2008). Relevance of granulocyte apoptosis to resolution of inflammation at the respiratory mucosa. *Mucosal Immunology* 1, 350-363.
- Livingstone E., Livingstone S. (1970). Pharmacological experiments on isolated preparations. Department of Pharmacology, University of Edinburgh, Edinburgh, 2d edition.
- Lobao A., Mello-Silva R., Forzza R. (2012). Guatteria (Annonaceae) da Floresta Atlântica brasileira. *Rodriguésia* 63, 1039–1064.
- Maas P., Menega L., Westra T. (1994). Studies in Annonaceae. XXI. Index to species and infrageneric taxa of neotropical Annonaceae. *Candollea* 49, 389-481.
- Matera S., Piersante M.V., Ragone M.I., Consolini A.E. (2012). Sedative and antispasmodic effects of stevia rebaudiana and noncompetitive inhibition of intestinal contractility by stevioside.

Pharmacologyonline 1, 1-8.

McHale N., Hollywood M., Sergeant G., Thornbury K. (2006). Origin of spontaneous rhythmicity in smooth muscle. *Journal of Physiology* 570, 23-28.

Maskrey B., Megson I., Whitfield P., Rossi A. (2011). Mechanisms of resolution of inflammation: a focus on cardiovascular disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 31, 1001-1006.

Medzhitov R. & Janeway C. (2000). Innate Immunity. *The New England Journal of Medicine* 343, 338-344.

Meshkani R., Vakili S. (2016). Tissue resident macrophages: Key players in the pathogenesis of type 2 diabetes and its complications. *Clinica Chimica Acta* 1, 77-89.

Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65, 55-63.

Murillo J. (2001). Las Annonaceas de Colombia. *Biota Colombiana* 2, 49-58.

Ngiefu C., Paquot C., Vieux A. (1976). Oil-bearing plants of Zaire. II. Botanical families providing oils of medium unsaturation. *Oleagineux*, 545-547.

Nicoletti I., Megliorati G., Pagliacci M.C., Grignani F., Riccardi C. (1991). A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Journal of Immunological Methods* 139, 271-279.

Nicoreta P., Leist M., Manzo L. (1999). Neuronal cell death: a demise with different fates. *Trends in Pharmacological Sciences* 20, 46-51.

Penninger M., Kroemer G. (1998). Molecular and cellular mechanisms of T lymphocyte apoptosis. *Advances in Immunology* 68, 51-144.

Petkov G.V. (2011). Role of potassium ion channels in detrusor smooth muscle function and dysfunction. *Nature Reviews Urology* 9, 30-40.

Philyppov I.B., Golub A.A., Boldyriev O.I., Shtefan N.L., Totska K., Voitychuk O.I., Shuba,

Y.M. (2016). Myorelaxant action of fluorine-containing pinacidil analog, floccalin, in bladder smooth muscles mediated by inhibition of L-type calcium channels rather than activation of KATP channels. *Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 389, 585-592.

Preedy V. (2016). Essential oils in food preservations, flavor and safety. Department of Nutrition and Dietetics, King's College London, UK.

Quéguineur B, Goya L, Ramos S, Martín M, Mateos R, Bravo L. (2012). Phloroglucinol: Antioxidant properties and effects on cellular oxidative markers in human HepG2 cell line. *Food and Chemical Toxicology* 50, 2886–2893.

Rang H., Dale M., Ritter J., Flower R. 2008. Farmacología. Sexta edición. p. 54-65. ISBN: 978-0-443-06911-6.

Ragone M.I., Sella M., Conforti P., Volonté M.G., Consolini A.E. 2007. The spasmolytic effect of *Aloysia citriodora*, Palau (South American cedrón) is partially due to its vitexin but not isovitexin on rat duodenums. *Journal of Ethnopharmacology* 113, 258-66.

Ríos J.L., Recio M.C., Manéz S., Giner R.M. (2000). In Studies in Natural Products Chemistry: Bioactive Natural Products. *Atta-ur-Rahman* 22, 93-143

Rojano B. (2007). Tesis doctoral: Sustancias bioactivas de *Oxandra xylopioides*. Universidad Nacional de Colombia (Sede Medellín).

Rojano B., Pérez E., Figadère B., Martín M., Recio M., Giner R. (2007a). Constituents of *Oxandra* cf. *xylopioides* with antiinflammatory activity. *Journal of Natural Products* 70, 835-838.

Rojano B., Gaviria M., Saéz J., Yepes F., Muñoz F., Ossa F. (2007b). Berenjenol aislado de *Oxandra* Cf *Xylopioides* (Annonaceae) como insecticida. *Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica* 14, 95-100.

Rojano B., Gaviria C., Gil A., Sáez J., Schinella G., Tournier H. (2008). Actividad antioxidante del isoespintanol en diferentes medios. *Vitae* 1, 173-181.

Rojano B., Saenz J., Schinella G., Quijano J., Vélez E., Gil A., Notario R. (2008). Experimental and theoretical determination of the antioxidante properties of isoespintanol (2-isopropyl-3,6-

dimethoxy-5-methylphenol). *Journal of Molecular Structure* 877, 1-6.

Sastry P., Rao K. (2000). Apoptosis and the nervous system. *Journal of Neurochemistry* 74, 1-10.

Schinella G., Aquila S., Dade M., Giner R., Recio M., Spegazzini E., Buschiazzi P., Tournier H., Ríos J. (2008). Anti-Inflammatory and Apoptotic Activities of Pomolic Acid Isolated from *Cecropia pachystachya*. *Planta Medica* 74, 215–220.

Scull Lizama R., Miranda M., Infante R. (1998). Plantas medicinales de uso tradicional en Pinar del Río: estudio etnobotánico. *Revista Cubana de Farmacia* 32, 57-62.

Serhan C., Chiang N., Van Dyke T. (2008). Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nature Reviews Immunology* 8, 349–361.

Silverthorn D. (2008). Fisiología humana. Editorial Panamericana. Sexta edición. ISBN 9789500619820

Simmons D. L. (2006). What makes a good anti-inflammatory drug target?. *Drug Discovery Today* 11, 210-219.

Smith R., McClure M., Smith M., Abel P., Bradley M. (2007). The role of voltage-gated potassium channels in the regulation of mouse uterine contractility. *Reproductive Biology and Endocrinology* 5, 41-49.

Sousa E., Carvalho A., Roque N., Vieira G., Lago J., Chaves M. (2014). Terpenes and steroids from leaves of *Oxandra sessiliflora* R. E. Fries. *Phytochemistry Letters* 8, 193–195.

Spedding M. (1985). Competitive interactions between Bay K 8644 and nifedipine in K⁺ depolarized smooth muscle: a passive role for Ca²⁺. *Archives of Pharmacology* 328, 464-466.

Tsabang N., Valère P., Fokoub T., Yamthe L., Noguema B., Bakarnga-Viab I., Dongmo M., Aloys N., Fekam F. (2012). Ethnopharmacological survey of Annonaceae medicinal plants used to treat malaria in four areas of Cameroon. *Journal of Ethnopharmacology* 139, 171– 180.

Van der Brink F.G. (1977). General theory of drug-receptor interactions. Drug-receptor interaction models. Calculation of drug parameters. Editorial Van Rossum, J.M. (Ed.), 169-254.

Vanaclocha B. & Cañigüeral S. (2003). Fitoterapia: Vedemecum de prescripción. Cuarta edición. Editorial Masson. p: 67-77.

Vandenabeele P., Vanden T., Festjens N. (2006). Caspase inhibitors promote alternative cell death pathways. *Science Signaling* 358, 44-51.

Winston F. & Lynn C. (1992). Terpenoid constituents of *Oxandra asbeckii*. *Journal of Natural Products* 55, 701-706.

Zhan J., Abdel O., El Shabradwy A., El Shanawany M. Schiff P., Slatkin D. (1987). New Azafluorene alkaloids from *Oxandra xylopiodes*. *Journal of Natural Products* 50, 800-806.

Zhuang Y., Zhu X., Huang L. (2003). Antispasmodics and anticholinergics. In: Neeshat QM, editor. Pharmaguide. Pharmaguide Publishing Company 16, 66–70.

Otras fuentes:

Prospecto de medicamento Nero ® 40 de Laboratorios Elea S.A. 1996.